

# **Interaktion von cytosolischen Hsp70-Isoformen mit dem glyoxysomalen DnaJ-Protein**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Jörg Diefenbach**

aus Ludwigshafen

Marburg (Lahn) 1999

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am: 18.10.1999

Erstgutachter:	Prof. Dr. H. Kindl
Zweitgutachter:	Prof. Dr. M. Marahiel
Tag der mündlichen Prüfung:	27.10.1999

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>9</b>
2.1	Material.....	9
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Kits und Geräte .....	9
2.1.2	Oligonukleotide .....	12
2.2	Präparation und Gelelektrophorese von RNA .....	13
2.2.1	Präparation von Gesamt-RNA.....	13
2.2.2	Isolierung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA .....	14
2.2.3	Denaturierende Gelelektrophorese von RNA.....	14
2.3	Präparation und Gelelektrophorese von DNA .....	15
2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	15
2.3.2	Präparation von genomischer DNA.....	15
2.3.3	PCR-Amplifikation von genomischer DNA.....	15
2.3.4	Gelelektrophorese von DNA .....	17
2.4	Prinzipielle Verfahren in der Analyse von Nukleinsäuren .....	18
2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	18
2.4.2	Extraktion mit Phenol/Chloroform.....	18
2.4.3	Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol.....	18
2.4.4	Sequenzierung von DNA.....	18
2.5	Verfahren zur Klonierung von DNA .....	20
2.5.1	Verdau mit Restriktionsendonukleasen .....	20
2.5.2	Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	20
2.5.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	22
2.5.4	Dephosphorylierung von DNA.....	23
2.5.5	Ligation von DNA .....	23
2.5.6	Transformation in kompetente Zellen von E. coli .....	23
2.6	Radioaktive Markierung von DNA .....	24
2.6.1	Markierung von dsDNA .....	24
2.6.2	Markierung von Oligonukleotiden .....	24
2.7	Herstellung einer cDNA-Bibliothek .....	25
2.7.1	cDNA-Synthese .....	25
2.7.2	Amplifikation der Einzelstrang-cDNA durch PCR .....	25
2.7.3	Adaptorligation und Größenfraktionierung .....	25
2.7.4	Ligation und Transformation.....	25
2.7.5	Herstellung von Master- und Replikafilern .....	26
2.7.6	Koloniehybridisierung .....	27

2.8	gekoppelte Transkription und Translation in vitro .....	28
2.8.1	Aufarbeitung der Translationsansätze für Wechselwirkungsexperimente .....	29
2.9	Bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter Proteine .....	29
2.9.1	Herstellung des Expressionsvektors .....	29
2.9.2	Expression von Fusionsproteinen .....	30
2.9.3	Aufarbeitung und Reinigung von Fusionsproteinen .....	30
2.10	Analyse von Proteinen .....	32
2.10.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	32
2.10.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	32
2.10.3	Säuredenaturierung von Proteinen .....	33
2.10.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) .....	33
2.10.5	2-dimensionale Gelelektrophorese .....	34
2.10.6	Proteinfärbung .....	36
2.10.7	Detektion von radioaktiv markierten Proteinen .....	36
2.11	Immunologische Verfahren .....	37
2.11.1	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western-Blot) .....	37
2.11.2	Immunfärbung .....	37
2.12	Zellfraktionierung von Cucumis sativus .....	39
2.12.1	Aufarbeitung von Gurkenkotyledonen .....	39
2.12.2	Subfraktionierung von Glyoxysomen .....	40
2.13	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und DnaJ-Proteinen .....	41
2.14	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und Glyoxysomen .....	41
2.15	Messung der ATPase-Aktivität von Hsp70 .....	43
2.15.1	Dünnschichtchromatographie von radioaktiv markierten Nukleotiden .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
3.1	Isolierung und Klonierung von genomischer DNA und cDNA von zwei cytosolischen Isoformen von Hsp70 .....	44
3.1.1	Präparation von genomischer DNA und Verdau mit Restriktionsenzymen .....	45
3.1.2	Genome-Walker-PCR mit genspezifischen Primern für zwei verschiedene cytosolische Isoformen von Hsp70 .....	45
3.1.3	Struktur der Gene von zwei cytosolischen Isoformen von Hsp70 .....	47
3.1.4	Herstellung einer cDNA-Bibliothek und Screening nach cytosolischen Hsp70 .....	50
3.1.5	PCR-Amplifikation und Klonierung von cDNA-Sequenzen, die für die beiden cytosolischen Hsp70 kodierenden .....	53
3.2	Herstellung von Fusionsproteinen von beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen .....	56
3.2.1	Bakterielle Expression und Reinigung der beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine .....	56

---

3.2.2	Spaltung der Hsp70-GST-Fusionsproteine mit der Protease Faktor Xa.....	58
3.2.3	Herstellung von radioaktiv markierten Hsp70.....	60
3.3	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und DnaJ-Proteinen...	61
3.3.1	Bakterielle Expression und Reinigung von DnaJ-Proteinen .....	62
3.3.2	Nachweis der Wechselwirkung zwischen Hsp70-1-Translatat und His-DnaJp .....	63
3.3.3	Nachweis der Wechselwirkung zwischen GST-Hsp70-1 und His-DnaJp.....	65
3.3.4	Nachweis der Wechselwirkung zwischen GST-Hsp70-1 und Sis-Proteinen .....	66
3.3.5	Nachweis der Bindung von Hsp70-1-Translatat an Glyoxysomen.....	67
3.4	Analyse von Hsp70 in Glyoxysomen .....	71
3.5	Zusätzliche Belege für die Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen mit DnaJ-Proteinen durch Analyse der Hsp70-ATPase-Aktivität.....	73
3.5.1	Untersuchung der für die ATPase-Tests verwendeten gereinigten Fusionsproteine auf Abwesenheit von DnaK.....	73
3.5.2	Einfluß von His-DnaJp auf die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70	75
3.5.3	Einfluß von <i>Pm</i> -Sis1p auf die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70..	76
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>77</b>
4.1	Aufbau der Gene von zwei cytosolischen Isoformen von Hsp70.....	77
4.2	Die cytosolische Hsp70-Isoform 1 als Wechselwirkungspartner von DnaJ-Proteinen ...	79
4.3	Nachweis von Hsp70-Isoformen in der Matrix von Glyoxysomen .....	82
4.4	Bedeutung von Molekularen Chaperonen beim Proteinimport in Peroxisomen .....	86
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>89</b>

**Abkürzungen**

A	Adenin
Abb.	Abbildungen
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
d	Tag(e)
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreit
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat- $\text{Na}_2$
ER	Endoplasmatisches Retikulum
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
min	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	$\text{Ni}^{2+}$ -Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion

---

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
poly(A) <sup>+</sup> -RNA	RNA mit Poly(A)-Schwanz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rt	Raumtemperatur
S	Svedberg-Konstante
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

## 1 Einleitung

### *Das Konzept der „molecular chaperones“*

Die Faltung neu synthetisierter Proteine in der Zelle wird durch eine Klasse konservierter Proteine unterstützt, die als „molecular chaperones“ bezeichnet werden (Ellis und van der Vies, 1991; Hartl, 1996). Diese verhindern sowohl unter normalen Bedingungen als auch unter Stressbedingungen, wie z. B. bei Hitzeschock, die Ausbildung falsch gefalteter Proteinstrukturen. Man unterscheidet zwischen dem Hsp70-Chaperon-System und dem Chaperonin-System. Beide übernehmen verschiedene Aufgaben bei der Proteinfaltung, wobei jedoch beiden Systemen ein ATP-abhängiger Mechanismus zugrundeliegt.

Proteine der Hsp70-Familie und deren regulatorische Partnerproteine (Co-Chaperone) stabilisieren neu translatierte Proteine, bis alle Segmente einer Polypeptidkette vorhanden sind, die für eine Faltung nötig sind (Becker und Craig, 1994; Hendrick und Hartl, 1993).

Die Chaperonine sind große, oligomere Proteinkomplexe aus zwei übereinandergestapelten Ringen, die eine korrekte Proteinfaltung in der geschützten Umgebung ihres zentralen Hohlraumes unterstützen (Netzer und Hartl, 1998).

### *Das Hsp70-Chaperon-System*

Die Mitglieder der Hsp70-Familie sind hochkonservierte Proteine (Boorstein *et al.*, 1994) mit einer molekularen Masse von ca. 70-75 kDa; sie besitzen eine ATPase-Aktivität. Man findet sie in Prokaryonten (DnaK in *Escherichia coli*) und den meisten Kompartimenten eukaryontischer Zellen. Sie übernehmen wichtige Funktionen in der Zelle; so sind sie z. B. an der Stabilisierung neu synthetisierter oder ungefalteter Polypeptidketten beteiligt, sie unterstützen die Translokation ungefalteter Polypeptidketten über Membranen von Organellen, sie sind beteiligt beim Auf- und Abbau von Proteinkomplexen, und sie spielen eine Rolle beim Targeting von Proteinen zum Proteinabbau in Lysosomen (Becker und Craig, 1994; Hendrick und Hartl, 1993). Außerdem übernehmen Hsp70s eine wichtige Funktion in der Apoptose (Gabai *et al.*, 1998; Jaattela *et al.*, 1998), beim nukleären Proteintransport (Shulga *et al.*, 1999) und bei der Immunantwort (Multhoff *et al.*, 1998).

Diese Vielseitigkeit ergibt sich aus der fundamentalen Eigenschaft von Hsp70 hydrophobe Segmente ungefalteter Polypeptide in einem ATP-Hydrolyse-abhängigen Reaktionszyklus zu binden bzw. wieder von ihnen abzu dissoziieren und dadurch eine Aggregation zu verhindern. Die Regulation dieses Zykluses erfolgt durch andere Proteine (Co-Chaperone), wie z. B. Mitgliedern der Hsp40-Familie (Cyr *et al.*, 1994). In Anlehnung an das in *E. coli* vorkommende DnaJ, welches die ATPase-Aktivität des DnaK mitreguliert, werden die eukaryontischen Mitglieder der Hsp40-Familie auch als DnaJ-Homologe bezeichnet (Kelley, 1998).



Die verschiedenen Partnerproteine von Hsp70 haben die wichtige Aufgabe, die ATPase-Aktivität des zugehörigen Hsp70 zu regulieren, und darüberhinaus determinieren sie die genaue Funktion eines Hsp70, da je nachdem mit welchem Partnerprotein ein Hsp70 interagiert, ein einziges Hsp70 verschiedene Aufgaben in der Zelle übernehmen kann (Kelley, 1999; Rasow *et al.*, 1995)

Obwohl Hsp70s im Verlauf der Evolution hochkonserviert geblieben sind, sind sie funktionell nicht austauschbar (Brodsky und Schekman, 1993). Eine Klasse cytosolischer Hsp70 aus Bäckerhefe (Ssb-Proteine) kann z. B. nicht die Funktion einer anderen Klasse cytosolischer Hsp70 (Ssa-Proteine) bei der Enthüllung clathrinumhüllter Vesikel übernehmen. Sogar die beiden sehr homologen, cytosolischen Hsp70 aus Hefe Ssa1p und Ssa2p zeigen eine unterschiedliche Aktivität bei der Enthüllung clathrinumhüllter Vesikel (Gao *et al.*, 1991).

### *Struktur und Funktion von Hsp70 und DnaJ (Hartl, 1996)*

Die Struktur von Hsp70s läßt sich aufteilen in eine hochkonservierte N-terminale ATPase-Domäne von ca. 385 Aminosäuren, die strukturell sehr gut charakterisiert ist (etwa 64 % Identität zwischen eukaryontischen Hsp70s). Es folgt eine ca. 225 Aminosäuren lange Sequenz, die die Peptid-Bindungsdomäne enthält (etwa 43 % Identität; Wang *et al.*, 1993). Am C-Terminus befindet sich eine ca. 30 Aminosäuren lange, G/P-reiche Region, die eine vergleichsweise geringe Homologie zwischen verschiedenen Hsp70s aufweist.

Bei cytosolischen Hsp70 endet die C-terminale Sequenz mit einem konservierten EEVD-Motiv, welches sowohl auf die ATPase-Aktivität, als auch auf die Interaktion des Hsp70 mit Substratpeptiden und DnaJ-Homologen einen regulatorischen Einfluß hat (Freeman *et al.*, 1995).

Für ein etwa 10 kDa großen Segment des C-Terminus wird eine Interaktion mit DnaJ-Homologen vermutet (Cyr *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993).

In einer Röntgenstrukturanalyse zeigte die ATPase-Domäne ein fast identisches Faltungsmuster wie das globuläre, monomere Actin-G (Flaherty *et al.*, 1990). Darüberhinaus überträgt sie bei ATP-Bindung eine Konformationsänderung an die C-terminale Peptidbindungsdomäne (Liberek *et al.*, 1991). In der ATPase-Domäne sind zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen enthalten (Sriram *et al.*, 1997).

Es konnte gezeigt werden, daß die Konformation der ATPase-Domäne und der Peptidbindungsdomäne gekoppelt sind, wodurch es sowohl bei der Bindung eines ungefalteten Peptids, als auch bei der Bindung eines Nukleotids zu einer Konformationsänderung beider Domänen kommt. Hsp70 kann in insgesamt drei verschiedenen Konformationen vorliegen; in einer Nukleotid-freien Form bzw. einer ADP- oder einer ATP-gebundenen Form (Fung *et al.*, 1996).

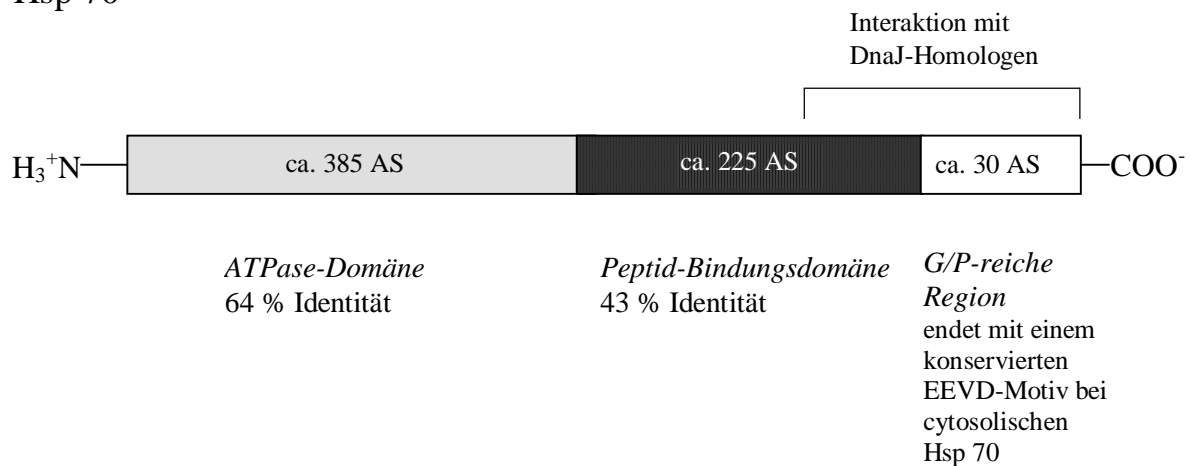
Proteine der Hsp40-Familie enthalten typischerweise einen oder mehrere Abschnitte mit einer Sequenz-Homologie zu *E. coli* DnaJ, einem domänenartig aufgebauten 41 kDa-Protein.

Die N-terminale, ca. 70 Aminosäuren umfassende, sogenannte „J-Domäne“ ist in allen Hsp40s anzutreffen. Eine NMR-Struktur-Analyse zeigte, daß die J-Domäne aus vier  $\alpha$ -Helices besteht, zwischen denen eine konservierte, exponierte HPD-Sequenz liegt (Hill *et al.*, 1995). Mutationen dieses Tripeptids verhinderten eine Interaktion mit DnaK, woraus gefolgert wurde, daß die J-Domäne für eine Interaktion mit Hsp70 verantwortlich ist (Wall *et al.*, 1994). Diese Vermutung wurde bestätigt, als gefunden wurde, daß geringfügige, strukturelle Unterschiede zwischen den J-Domänen verschiedener Hsp40s wichtig sind für eine Interaktion mit spezifischen Hsp70-Partnern (Schlenstedt *et al.*, 1995).

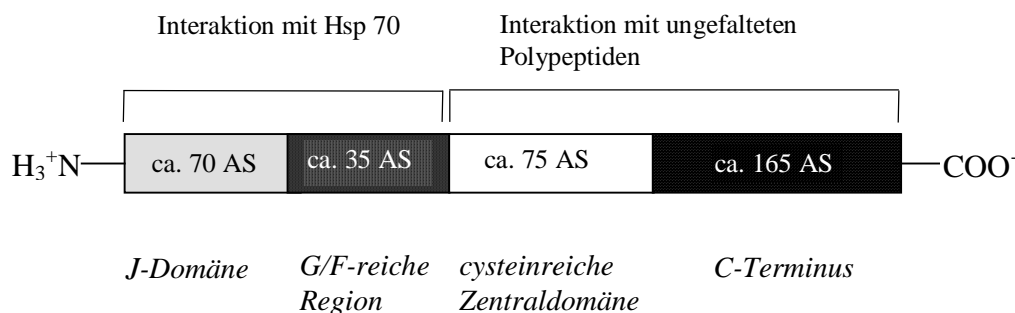
Der J-Domäne folgt eine ca. 35 Aminosäuren umfassende G/F-reiche Region und eine cysteinreiche Zentraldomäne aus ca. 75 Aminosäuren, die jedoch nicht in allen Hsp40s vorkommt. Es folgt ein ca. 165 Aminosäuren umfassender C-Terminus, der wenig Homologien unter den Proteinen aufweist.

Die ca. 75 Aminosäuren umfassende Zentraldomäne enthält zwei Zinkatome, die in Analogie zu dem Zinkfingermotiv DNA-bindender Proteine, jeweils durch vier Cysteinreste koordiniert sind. Eine Interaktion von DnaJ mit ungefalteten Polypeptiden findet über diese cysteinreiche Zentraldomäne statt (Mackay und Crossley, 1998; Szabo *et al.*, 1996).

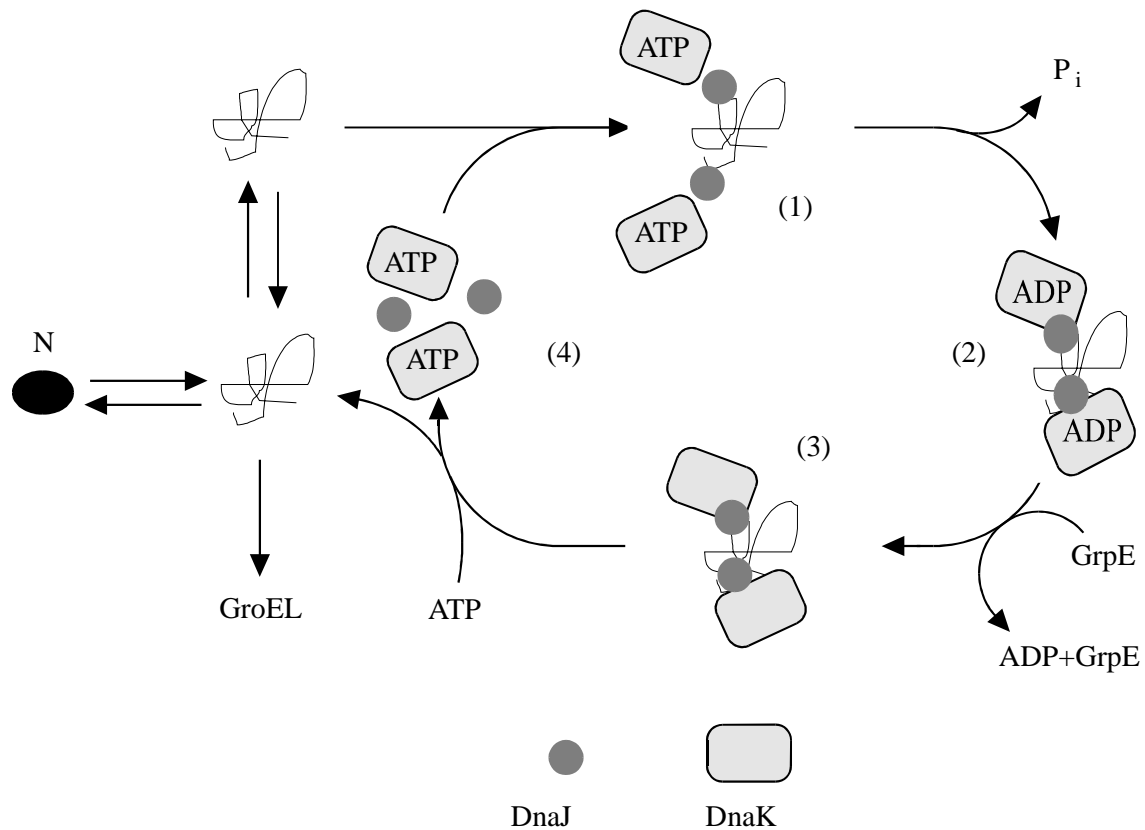
## Hsp 70



## DnaJ



Der ATP-Hydrolyse-abhängige Reaktionszyklus der Interaktion mit ungefalteten oder partiell gefalteten Peptiden ist beim bakteriellen DnaK und den zugehörigen Co-Faktoren DnaJ und GrpE gut verstanden (Hartl *et al.*, 1994; Laufen *et al.*, 1999):



**Abb. 1.1: Modell des Reaktionszyklus von DnaK, DnaJ und GrpE bei der Proteinfaltung in Bakterien.**

(1) Ungefaltetes Protein interagiert mit DnaJ. DnaK in der ATP-gebundenen Form wechselwirkt mit DnaJ wodurch es zur Hydrolyse des gebundenen ATPs zu ADP kommt. Hierdurch bildet sich ein stabiler ternärer Komplex (2). Der Nukleotidaustauschfaktor GrpE bewirkt ein Abdissoziieren des an das DnaK gebundenen ADPs (3). Durch die Bindung von ATP an DnaK kommt es zum Zerfall des ternären Komplexes (4). Das Proteinsubstrat kann sich nun spontan zum nativen Zustand (N), zur erneuten Stabilisierung einen weiteren Reaktionszyklus durchlaufen oder in Wechselwirkung mit dem Chaperonin GroEL zum nativen Zustand gefaltet werden (Langer *et al.*, 1992).

Die Regulation des eukaryontischen Hsp70-Systems dagegen ist weniger gut verstanden, da eine Vielzahl weiterer Faktoren benötigt werden (Höhfeld, 1998).

Bei der Regulation des humanen Hsp70-ATPase-Zyklus wurden insgesamt fünf verschiedene Proteine bzw. Proteinfamilien identifiziert (Ballinger *et al.*, 1999).

Neben dem DnaJ-Homologen Hsp40 sind dies die Familie der BAG-Proteine (Bimston *et al.*, 1998), von denen insgesamt fünf humane Vertreter charakterisiert wurden (Takayama *et al.*, 1999). Sie inhibieren die ATPase-Aktivität von Hsp70 durch Bindung an die ATPase-Domäne.

Das C-Terminus of **Hsc70-interacting protein** CHIP inhibiert ebenfalls die ATPase-Aktivität von Hsp70, jedoch durch Bindung an dessen C-Terminus (Ballinger *et al.*, 1999).

Eine ähnliche Funktion übernimmt auch das **Hsc70-interacting protein** Hip (Höhfeld *et al.*, 1995), welches den ADP-gebundenen Zustand von Hsp70 stabilisiert und eine wichtige Rolle in Hsc70/Hsp90-Chaperone-Komplexen zu spielen scheint (Prapapanich *et al.*, 1996).

Hierbei ist auch das **Hsc70/Hsp90-organizing protein** Hop von Bedeutung (Smith *et al.*, 1995), da es die Wechselwirkung zwischen Hsc70 und Hsp90 vermittelt (Chen *et al.*, 1996).

Eukaryontische GrpE-Homologe hat man bisher nur in Mitochondrien und Chloroplasten gefunden (Padidam *et al.*, 1999; Schlicher und Soll, 1997).

### *Die Familie der „Microbodies“ (Olsen und Harada, 1995)*

Als „Microbodies“ bezeichnete man ursprünglich Organellen, die bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Nierenzellen von Mäusen entdeckt worden waren (Rhodin, 1954). Es handelt sich um Organellen, die im Gegensatz zu Mitochondrien und Chloroplasten von einer Einfachmembran umgeben sind, einen Durchmesser von 0.2 - 1.7  $\mu\text{m}$  haben und eine hohe Gleichgewichtsdichte von ca. 1.24  $\text{g/cm}^3$  besitzen (Frederick *et al.*, 1968). Sie enthalten weder DNA noch Ribosomen (Douglass *et al.*, 1973). Alle Proteine sind im Zellkern codiert, werden an freien Polysomen im Cytosol translatiert und post-translational in bereits bestehende Organellen importiert (Borst, 1989; Huhse und Kunau, 1995; Subramani, 1996). Als charakteristische Proteine besitzen sie die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation (Opperdoes, 1987).

Untersuchungen von de Duve und Baudhuin (1966) zeigten, daß Microbodies in Säugetiergewebe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produzierende Oxidasen (Peroxidasen) und eine Wasserstoffperoxid abbauende Katalase besitzen, woraufhin sie die Organellen als Peroxisomen bezeichneten.

Eine besondere Klasse pflanzlicher Peroxisomen sind die Glyoxysomen, die während der Samenkeimung von Bedeutung sind. Sie enthalten neben den Enzymen der  $\beta$ -Oxidation mit Ausnahme der im Cytosol lokalisierten Aconitase (Courtois-Verniquet und Douce, 1993) alle Enzyme des Glyoxylatzykluses (Koller und Kindl, 1977) und stellen somit durch die Mobilisierung von Speicherlipiden die Bausteine zum Wachstum der Keimlinge zur Verfügung.

Das neue Peroxisomen nicht notwendigerweise ausschließlich durch die Teilung bereits vorhandener Peroxisomen entstehen können, zeigten South und Gould (1999). In einer humanen Zelllinie mit einem Importdefekt für peroxisomale Membranproteine konnten weder intakte Peroxisomen noch peroxisomale Membranen nachgewiesen werden. Untersuchungen zeigten, daß dieser Phänotyp durch eine inaktivierende Mutation im *PEX16* Gen verursacht wurde. Die Expression von Pex16p führte in dieser Zelllinie zur Ausbildung von neuen Peroxisomen.

*Proteinimport in Peroxisomen (Boston et al., 1996; Gietl, 1996; Hettema et al., 1999)*

Die meisten glyoxysomalen/peroxisomalen Proteine werden in ihrer fertigen Größe an freien Polysomen im Cytosol translatiert und es findet keine Prozessierung während oder nach dem Import in das Organell statt (Olsen, 1998; Subramani, 1996).

Diese Proteine müssen somit ein Peroxisomen-Targeting-Signal (PTS) in ihrer fertigen Polypeptidsequenz besitzen.

Bisher sind drei verschiedene Arten von Peroxisomen-Targeting-Signalen von Proteinen der Peroxisomenmatrix identifiziert worden:

- das erste charakterisierte Peroxisomen-Targeting-Signal, welches auch als PTS1 bezeichnet wird, besteht aus einem C-terminalen Tripeptid mit einer Konsensussequenz aus Serin, Lysin und Leucin (SKL), (Gould *et al.*, 1987).  
Gould *et al.* (1990) und Keller *et al.* (1991) konnten die hohe Konservierung dieses Targeting-Signals in der Evolution zeigen, als sie feststellten, daß ein Protein mit einem SKL-Motiv sowohl bei Hefen, als auch bei Pflanzen, Insekten und Säugetieren in Peroxisomen importiert wird.  
Neuere Untersuchungen deuten daraufhin, daß nicht nur die Konsensussequenz des Targeting-Signals für einen Import von Bedeutung ist, sondern vielmehr auch die genaue Konformation des Proteins. Behari und Baker (1993) konnten zeigen, daß Deletionsmutanten von Isocitrat-Lyase, denen die PTS1-Sequenz fehlte, erfolgreich in Glyoxysomen importiert werden konnten.
- für einige peroxisomale Proteine wurde eine aminoterminal Signalsequenz gefunden, die während oder kurz nach dem Import abgespalten wird (PTS2). Dieses Targeting-Signal wurde für 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (Preisig-Müller und Kindl, 1993; Swinkels *et al.*, 1991) und für Malat-Dehydrogenase (Gietl, 1990) beschrieben.
- daneben gibt es einige peroxisomale Proteine, die weder ein carboxy-terminales (PTS1) noch ein amino-terminales, abspaltbares (PTS2) Targeting-Signal besitzen (Roggenkamp, 1992). Acyl-CoA Oxidase aus *Candida tropicalis* z. B. besitzt zwei interne Aminosäuresequenzen, die unabhängig voneinander einen Import von Fusionproteinen in Peroxisomen bewirken (Small *et al.*, 1988). Somit sind in einigen Fällen mehrere Targeting-Signale in einem Protein vorhanden, von denen jedes für sich bereits einen Import in Peroxisomen bewirkt.

Die prinzipielle Aufgabe der Peroxisomen-Targeting-Signale besteht darin, daß die glyoxysomalen/peroxisomalen Proteine von Faktoren erkannt werden, die einen spezifischen Import in das Organell bewirken. Bei solchen Faktoren handelt es sich um lösliche und membrangebundene Rezeptoren, von denen durch genetische Untersuchungen an verschiedenen Orga-

nismen bisher 22 Proteine identifiziert wurden, die für die Peroxisomen-Biogenese von Bedeutung sind (Hettema *et al.*, 1999). Diese Proteine werden auch als Peroxine (Abkürzung Pex) bezeichnet (Distel *et al.*, 1996).

Die Faltung und teilweise auch die Oligomerisierung einiger peroxisomaler Matrixproteine erfolgt vor dem eigentlichen Importvorgang, wodurch sich der Proteinimport in Peroxisomen fundamental vom Proteinimport in andere Zellorganellen unterscheidet (McNew und Goodman, 1996).

Folgende Befunde machen diese Unterschiede deutlich:

- Proteinuntereinheiten ohne Peroxisomen-Targeting-Signal können mit Untereinheiten die ein Targetingsignal tragen im Cytosol oligomerisieren und in Peroxisomen importiert werden (Glover *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997).
- Der *in vivo* Import eines Fusionsproteins bestehend aus dem Peroxisomen-Targeting-Signal 1 und Dihydrofolat-Reduktase wurde durch den konformationsstabilisierenden Liganden Aminopterin nicht inhibiert (Häusler *et al.*, 1996).
- Sogar 9 nm große Goldpartikel versehen mit einem PTS1-Peptid können in Peroxisomen importiert werden (Walton *et al.*, 1995).

Trotz dieser Befunde ist eine Beteiligung von *Molecular Chaperones* beim Proteinimport in Peroxisomen mittlerweile akzeptiert (Hettema *et al.*, 1999):

- Die Notwendigkeit von Proteinen der Hsp70-Familie für einen effizienten Proteinimport in Peroxisomen konnte durch *in vitro* Importversuche gezeigt werden (Walton *et al.*, 1994).
- das cytosolische DnaJ-homologe Protein Djp1p der Bäckerhefe ist absolut notwendig für einen effizienten Import peroxisomaler Matrixproteine (Hettema *et al.*, 1998).
- In der Matrix von Glyoxysomen in Wassermelone konnte ein Hsp70 nachgewiesen werden (Wimmer *et al.*, 1997).

Was die Beteiligung von Molekularen Chaperonen beim Proteinimport in Peroxisomen betrifft, ergeben die gegenwärtigen Kenntnisse kein eindeutiges Bild über die Verteilung und genaue Funktion von Hsp70s und DnaJ-Proteinen in Peroxisomen. Möglicherweise ergibt sich ein recht komplexes Bild wie beim Proteinimport in das ER oder in Mitochondrien.

---

*Aufgabenstellung*

Im Rahmen der Dissertation sollten Hsp70s als Partnerproteine des an der cytosolischen Seite der Glyoxysomen verankerten DnaJ-Proteins aus Gurke identifiziert werden (Preisig-Müller *et al.*, 1994). Aus Vorarbeiten war bekannt, daß mit Hilfe einer löslichen Form des DnaJp mit His-Tag bei Anwesenheit von ADP cytosolische Isoformen von Hsp70 aus dem 100000 x g Überstand einer Zellfraktionierung in Form eines Komplexes immobilisiert werden können (Diefenbach, 1997). Es sollte die Frage geklärt werden, welche der verschiedenen Isoformen von Hsp70 Wechselwirkungspartner des DnaJp aus Gurke darstellen. Hierzu mußten cDNA-Sequenzen, die für die vollständige Aminosäuresequenz verschiedener cytosolischer Hsp70-Isoformen codieren, isoliert werden. Es sollte auch untersucht werden, ob Proteine der Hsp70-Familie auch in der Matrix von Glyoxysomen nachzuweisen sind, wie es für Glyoxysomen in Wassermelone beschrieben worden ist (Wimmer *et al.*, 1997).

## 2 Methoden

### 2.1 Material

Alle Geräte, hitzebeständige Lösungen und Medien wurden mit Wasserdampf bei 120°C, 2 bar 30 Minuten sterilisiert.

Lösungen temperaturempfindlicher Substanzen wurden sterilfiltriert.

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und Geräte

##### Chemikalien und Materialien:

Acrylamid/Diacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Natriumsalz	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-diphosphat, Natriumsalz	Boehringer, Mannheim
Agar-Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose, Typ I	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin, Na-Salz	Boehringer, Mannheim
Amplify™	Amersham, Braunschweig
Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	Serva, Heidelberg

Enzyme (Restriktionsenzyme, Proteasen, etc.) wurden von den folgenden Firmen bezogen: AGS, Amersham, Biomol, Life Technologies, MBI Fermentas, Roche Diagnostics und Sigma

Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Freiburg
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Biomol, Hamburg
Miracloth	Calbiochem, La Jolla, USA
Molekularmasse-Marker (DNA- und RNA-Marker)	Boehringer, Mannheim
Molekularmasse-Marker (SDS-Page)	Life Technologies, Eggenstein
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Nitrocellulosefilter	Schleicher & Schuell, Dassel



Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Phenol, TE gesättigt	Roth, Karlsruhe
PD10-Säule (Sephadex G25)	Pharmacia, Freiburg
Retikulozytenlysat	Promega, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion 5	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilme X-OMat AR	Kodak, Stuttgart
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Whatman 3MM Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

Chemikalien, die nicht aufgeführt sind, wurden von den folgenden Firmen bezogen:  
Amersham, Biomol, Merck, Roche Diagnostics, Roth, Serva und Sigma

#### Antikörper:

Anti-AcSis1p	Specht, 1997
Anti-csDnaJp-1	Preisig-Müller, 1993
Anti-cpHsp70 (plastidäres, stromales Hsp70)	Pretsch, 1996
Anti-cytHsp70	Diefenbach, 1997
Anti-Malat-Synthase	Kruse, 1981
Anti-MFP	Behrends, 1986
Anti-Thiolase	Behrends, 1986
Anti-DnaK	Stressgen
Anti-Glutathion-S-Transferase	Santa Cruz Biotechnology
Anti-His, Epitop: MRGSH <sub>6</sub>	Qiagen, Hilden
Anti-Kaninchen-IgG, HRP-Konjugat	Dako, Hamburg
Anti-Maus-IgG, HRP-Konjugat	Dako, Hamburg

#### Plasmide:

pT7T3-18U	Pharmacia, Freiburg
pSport 1	Life Technologies, Eggenstein
pQE-9	Qiagen, Hilden
pGEX-5x-1	Pharmacia, Freiburg
pCI	Promega, Mannheim
pcDNA3	Invitrogen

Kits:

ABI PRISM™ DNA-Sequencing-Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
DNeasy™ Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
Nick translation system (DNA-Markierung)	Life Technologies, Eggenstein
QIAEX™ II (DNA-Extraktionskit)	Qiagen, Hilden
QIAprep™ -Spin (Plasmidpräparationskit)	Qiagen, Hilden
SMART™ PCR cDNA Library Construction Kit	Clontech, Heidelberg

Pflanzenmaterial:

Samen der chinesischen Schlangengurke (*Cucumis sativus*, Fa. Küpper, Eschwege) wurden 1 h unter Rühren bei Raumtemperatur in Leitungswasser vorgequollen.

Die vorgequollen Gurkensamen wurden in einer Plastikschißel auf Filterpapier über feuchtem Vermikulit verteilt und das Gefäß mit Alufolie verschlossen. Die Keimung erfolgte im Dunkeln bei 100 % Luftfeuchtigkeit in einem auf 27 °C temperierten Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau).

Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> NM522:	<i>hsdΔ5 Δ(lac-pro) [F' lac IqZ ΔM15 pro<sup>+</sup>]</i> λ
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]:	Nal <sup>S</sup> Str <sup>S</sup> rif <sup>S</sup> lac <sup>-</sup> ara <sup>-</sup> gal <sup>-</sup> mtl <sup>-</sup> F <sup>-</sup> recA <sup>+</sup> uvr <sup>+</sup>

Die Handhabung der Bakterienstämme erfolgte nach den bei Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methoden. Es wurden dazu folgende Medien und Zusätze verwendet:

LB-Medium, pro Liter:	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl
Stammlösung Ampicillin:	100 mg/ml Ampicillin 100 µg/ml in LB-Medium
Stammlösung Kanamycin:	50 mg/ml Kanamycin 25 µg/ml in LB-Medium
Stammlösung IPTG:	238 mg/ml IPTG (1 M)
LB-Agarplatten:	1.5 % (w/v) Agar in LB-Medium

### 2.1.2 Oligonukleotide

#### Genome-Walker-Adaptor:

A1        5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3'  
 A2        5'-PO<sub>4</sub>-ACCTGCCC-NH<sub>2</sub>-3'

#### Adaptorprimer (AP):

AP1       5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'  
 AP2       5'-TATAGGGCTCGAGCGGC-3'

#### Primer für Hsp70-1:

1-ATG-*Xho* I        5'-ACGCTCGAGARGGCCGGTAAAGG-3'  
 1-EEVD-*Mlu* I       5'-AACACGCGTTAATCAACTTCTTCAATC-3'  
 1-rev I               5'-GTTGTCAAGCCACTGGACTG-3'  
 1-rev II              5'-CTCTTGCAAAGCTCTTTGCC-3'  
 1-rev III             5'-CGATGCATCGCTAAATCTTCGG-3'  
 1-rev IV              5'-CTAAATCTTCGGCCAATTAAACGC-3'  
 1-rev IV-*Bam* HI    5'-AAGGATCCTAAATCTTCGGCCAATTAAACGC-3'  
 NLS-antisense       5'-GTCTTTCTTGTTTTTCTCTTGAATTCTTGCACG-3'  
 1-antisense         5'-CATCGCCTCAATCCTCCCATCAC-3'  
 1-uni I               5'-CAGTGAAGAATGCCGTCGTC-3'  
 1-uni II              5'-CTAAGAAGATTGAGAACCGC-3'

#### Primer für Hsp70-2:

2-ATG-*Xho* I        5'-TCTCTCGAGTCCACTACCTCCATTATGG-3'  
 2-EEVD-*Mlu* I       5'-AACCGAAACGCGTAAAATTGGGAACCTTAGTCG-3'  
 2-rev I               5'-CCCCTCTTTCTCTTGGTTTG-3'  
 2-rev II              5'-ACTTGTTTCCTTCTTCGTGGG-3'  
 2-rev III             5'-CCAAGATCGAAGATCAAGGC-3'  
 2-uni I               5'-CAGCTCCGGCACCTTGGTAC-3'  
 2-uni I-*Mlu* I       5'-AAACGCGTCAGCTCCGGCACCTTGGTAC-3'  
 2-antisense         5'-CGCCGGTAAAACAGTGGCTTTCAC-3'  
 2-Forward-*Bam* HI 5'-GAGGCAGAGGGATCCAAGTCTGAAGATG-3'  
 2-Reverse-*Pst* I    5'-AAACCGAAACTGCAGAAATTGGGAAC-3'

Sequenzier-Primer:

pCI-rev	5'-TCACTGCATTCTAGTTGTGG-3'
pcDNA3-rev	5'-ACAGTCGAGGCTGATCAGCG-3'
CMV-Primer	5'-GCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
universal	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
pQE-for	5'-GAATTCATTAAAGAGGAGAAA-3'
pQE-rev	5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'

## 2.2 Präparation und Gelelektrophorese von RNA

### 2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte nach einer Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Hierbei wurden 5 g Kotyledonen unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder gemörsert. Das Pflanzenmaterial wurde in kleinen Portionen zu einer 100°C-heißen Lösung aus 50 ml wassergesättigtem Phenol und 50 ml Denaturierungslösung gegeben.

Denaturierungslösung:

4 M Guanidinium-thiocyanat  
25 mM Natriumcitrat, pH 7.0  
0.5 % (w/v) N-Lauroylsarcosin  
100 mM 2-Mercaptoethanol

Nach der Zugabe des Pflanzenmaterials wurde die heiße Suspension sofort mit einem Ultraturrax auf höchster Stufe gründlich homogenisiert. Anschließend wurde die Mischung auf Eis abgekühlt und es wurden 5 ml 2 M Natriumacetat, pH 4.0 und 10 ml einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (49:1) zugesetzt. Die Lösung wurde erneut mit einem Ultraturrax auf höchster Stufe gründlich homogenisiert und anschließend durch Zentrifugation bei 10000 x g (JA20, 14000 rpm, 10 min) die Phasen getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde ohne Interphase vorsichtig abgezogen, mit dem gleichen Volumen an wassergesättigtem Phenol versetzt und mit einem Ultraturrax auf höchster Stufe gründlich homogenisiert. Die Extraktion mit Phenol erfolgte solange, bis nach der Zentrifugation keine Interphase mehr zu erkennen war. Die Gesamt-RNA wurde anschließend durch Zugabe von 3 M Natriumacetat, pH 6.0 mit Ethanol bei - 80°C präzipitiert (2.4.3).

### 2.2.2 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Aus Gesamt-RNA wurde Poly(A)<sup>+</sup>-RNA durch Affinitätschromatographie mit Hilfe des Oligotex mRNA Maxi-Kits (Fa. Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

### 2.2.3 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Zur Analyse von RNA wurde die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in Formaldehyd-Agarosegelen mit 6.6 % (v/v) Formaldehyd durchgeführt.

Zur Herstellung von 1.3 %igen (w/v) Agarosegelen wurden 0.52 g Agarose in 25 ml Wasser aufgeschmolzen, nach Abkühlung auf ca. 55°C mit 7.86 ml 5 x Elektrodenpuffer sowie 7.14 ml 37 %iger Formaldehydlösung vermischt und in einer horizontalen Gelkammer mit Kamm ausgegossen. Nach dem Erhärten wurde die Gelmatrix mit 1 x Elektrodenpuffer überschichtet.

#### 5 x Elektrodenpuffer:

100 mM MOPS/NaOH, pH 7.0  
40 mM Natriumacetat  
5 mM EDTA

Ansetzen des Puffers: Die Natriumacetatlösung wurde autoklaviert, dann MOPS hinzugefügt, der pH-Wert eingestellt und anschließend EDTA zugegeben.

Zur Analyse der RNA-Proben wurde folgende Probenlösung präpariert:

#### Probenlösung:

3-5 µl (ca. 5 µg) der zu analysierenden RNA-Probe  
2 µl 5 x Elektrodenpuffer  
3.5 µl 37 % (v/v) Formaldehydlösung  
10 µl Formamid (deionisiert)  
1 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl)

Die Probenlösung wurde 10 Minuten bei 65°C denaturiert, kurz auf Eis gestellt und auf 1 x RNA-Probenpuffer eingestellt.

#### 10 x RNA-Probenpuffer:

0.42 % (w/v) Bromphenolblau  
0.42 % (w/v) Xylencyanol FF  
25 % (w/v) Ficoll Typ 400

Die Gelmatrix wurde mit den Proben beladen und die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 45 V für 2.5 h durchgeführt.

Als Längenstandard wurden die Molmarker II und III der Fa. Boehringer, Mannheim verwendet.

Größe der Fragmente in Kilobasen:

Molmarker II: 1.6, 1.9, 2.8, 5.3, 7.4.

Molmarker III: 0.3, 0.4, 0.6, 1.0, 1.6.

## **2.3 Präparation und Gelelektrophorese von DNA**

### **2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA**

Sowohl die Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation, ca. 20 µg DNA) als auch im präparativen Maßstab (Midipräparation, ca. 100 µg DNA) erfolgte mit käuflichen Reaktionsansätzen (QIAprep™-Spin Plasmidpräparations-Kit) der Fa. Qiagen, Hilden.

Die Präparationen beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lysis der Bakterienzellen (Birnboim und Doly, 1979) mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an Anionenaustauschersäulen. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers, wobei man die Plasmid-DNA nach den vorgeschriebenen Waschschritten meist mit 100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 von der Anionenaustauschersäule eluierte und den DNA-Gehalt der Lösung photometrisch bestimmte.

### **2.3.2 Präparation von genomischer DNA**

Zur Präparation von genomischer DNA aus Gurke wurde das DNeasy™ Plant Mini Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Ausgehend von sieben Tage alten, etioliert angekeimten Gurkenkeimlingen wurden 5 g Kotyledonen in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder gemörsert. 100 mg Pflanzenmaterial wurden abgewogen und nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet. Die Elution erfolgte mit 100 µl Puffer AE.

### **2.3.3 PCR-Amplifikation von genomischer DNA**

Fragmente von genomischer DNA wurden nach einer Methode von Siebert *et al.* (1995) durch PCR amplifiziert. Der Adaptor wurde durch Inkubation äquimolarer Mengen von Primer A1 Primer A2 für 3 Minuten bei 95°C hergestellt. Die Lösung ließ man bei Raumtemperatur abkühlen. Nach Ligation des Adaptors an verdauten genomische DNA wurde der Ligationsansatz

durch Zugabe von 180 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 , 1 mM EDTA um das 10fache verdünnt. Eine erste PCR wurde in 50 µl Volumina mit 5 µl der ligierten und verdünnten DNA durchgeführt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

10 mM Tris/HCl, pH 8.8  
 50 mM NaCl  
 3 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0.08 % (v/v) Nonidet P40  
 0.2 mM von jedem dNTP  
 0.4 µM Adaptor-Primer AP1  
 0.4 µM 1. genspezifischer Primer  
 1 U Taq-Polymerase

Folgende Zyklusparameter wurden verwendet:

<i>Denaturierung</i>	94°C	2 sec	
<i>Primeranlagerung/ Elongation</i>	72°C	4 min	7 Zyklen
<i>Denaturierung</i>	94°C	2 sec	
<i>Primeranlagerung/ Elongation</i>	67°C	4 min	32 Zyklen
<i>Nach dem letzten Zyklus</i>	67°C	8 min	

In einer zweiten PCR (ebenfalls 50µl) wurden 1µl der ersten Reaktion als Template für eine nested PCR verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes war bis auf die verwendeten Primer identisch. Als Primer wurden der Adaptor-Primer AP2 und ein zweiter genspezifischer Primer verwendet

Folgende Zyklusparameter wurden verwendet:

<i>Denaturierung</i>	94°C	2 sec	
<i>Primeranlagerung/ Elongation</i>	72°C	4 min	5 Zyklen
<i>Denaturierung</i>	94°C	2 sec	
<i>Primeranlagerung/ Elongation</i>	67°C	4 min	25 Zyklen
<i>Nach dem letzten Zyklus</i>	67°C	8 min	

5-10 % eines Reaktionsansatzes wurden in einem Agarosegel analysiert.

### 2.3.4 Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden zur Analyse oder Präparation in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurde 1-2 % (w/v) Agarose in Elektrodenpuffer eingewogen, bis zur Homogenität erhitzt und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C auf einem Gelträger mit Kamm ausgegossen. Nach dem Erhärten des Gelmaterials wurde die Gelmatrix mit Elektrodenpuffer überschichtet.

#### Elektrodenpuffer:

40 mM Tris/Essigsäure, pH 7.2  
20 mM Natriumacetat  
1 mM EDTA

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden auf 1 x Probenpuffer eingestellt und die Gelmatrix damit beladen. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Minigelapparatur mit einer konstanten Spannung von 80 V für 1-1.5 h durchgeführt.

#### 6 x Probenpuffer:

0.25 % (w/v) Bromphenolblau  
0.25 % (w/v) Xylencyanol FF  
15 % (w/v) Ficoll Typ 400

Nach dem Gellauf wurden die getrennten DNA-Fragmente durch Einlagerung von Ethidiumbromid auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht. Sollten präparative Proben aus der Gelmatrix isoliert werden, so wurde auf einem Transilluminator mit einer Wellenlänge von 366 nm gearbeitet, um eine Zerstörung der DNA während der Präparation aus der Gelmatrix zu verhindern.

Als Längenstandard wurde der Molmarker X der Fa. Boehringer, Mannheim verwendet.

#### Größe der Fragmente in bp:

75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216.



## **2.4 Prinzipielle Verfahren in der Analyse von Nukleinsäuren**

### **2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäurekonzentrationen wurden photometrisch in wäßriger Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierbei entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1 cm Schichtdicke ungefähr einer Konzentration von :

50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA  
37 µg/ml bei RNA  
25 µg/ml bei kurzkettigen Oligonukleotiden

Der Quotient der bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260/280}$ ) gemessenen Absorptionskoeffizienten gibt Aufschluß über die Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation. Bei sehr reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1.8 und 1.95, bei RNA-Lösungen zwischen 1.9 und 2.0 (Ibelgauf, 1990).

### **2.4.2 Extraktion mit Phenol/Chloroform**

Um Proteine von Nukleinsäuren zu trennen, wurden Nukleinsäure-haltige Lösungen mit einem Volumen eines Gemisches aus Phenol, welches mit TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) gesättigt war, und Chloroform (1:1) versetzt, gründlich homogenisiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (10000 x g, 1 Minute). Die obere, wäßrige Phase überführte man in eine neues Reaktionsgefäß und extrahierte auf die gleiche Weise, bis kein Protein mehr in der Interphase zu erkennen war. Phenolreste wurden durch Extraktion mit einem Volumen Chloroform entfernt und die gereinigten Nukleinsäuren durch Fällung mit Ethanol isoliert.

### **2.4.3 Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol**

Zur Fällung von Nukleinsäuren stellte man die Lösung auf 300 mM Natriumacetat (pH 6.6) ein und präzipitierte 1 h in 75 % (v/v) Ethanol bei -20°C. Anschließend wurde 15 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert, das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser oder in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 aufgenommen.

### **2.4.4 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung erfolgte mit doppelsträngiger DNA nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Hierzu wurde das ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet. Ausgangspunkt für die enzymatische Synthese von DNA entlang des als Matrize dienenden, zu sequenzierenden DNA-

Einzelstranges ist ein Oligonukleotid (Primer), das zu einem bestimmten Teil des Matrizenstranges komplementär ist und mit diesem hybridisiert.

Die eingesetzte, hitzestabile AmpliTaq™ DNA Polymerase katalysiert in Gegenwart aller vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und der vier fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs) die Synthese der zum Matrizenstrang komplementären Sequenz. Während der Synthesereaktion kommt es durch Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen und es findet eine starke Amplifikation der markierten DNA-Fragmente statt, da wie bei der PCR mehrere Reaktionszyklen durchlaufen werden. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann die Sequenzierung in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Für die Sequenzierung wurden 0.3-0.5 µg doppelsträngiger DNA eingesetzt, sowie 3.2 pmol des jeweiligen Primers.

Ein Sequenzierungsansatz (10 µl) enthielt folgende Komponenten:

4 µl Terminations-Mix (dNTPs, ddNTPs, DNA-Polymerase und weitere Komponenten)  
ca. 0.5 µg zu sequenzierende, doppelsträngige DNA  
1 µl Primer (3.2 pmol)  
mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt

Die Sequenzierreaktion wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

<i>Denaturierung vor dem ersten Zyklus</i>	96°C	30 sec	
<i>Denaturierung</i>	96°C	10 sec	
<i>Primeranlagerung</i>	50°C	5 sec	25 Zyklen
<i>Elongation</i>	60°C	4 Minuten	
<i>Nach dem letzten Zyklus</i>	4°C		

Zur Abtrennung der während der Sequenzierreaktion nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide wurde eine Ethanol-fällung der DNA-Fragmente durchgeführt. Hierzu wurde der Sequenzier-Ansatz mit 80 µl Wasser, 10 µl 3 M Natriumacetatlösung, pH 4.6, 250 µl 96 %igem Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, nochmals 20 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert, bei 37°C getrocknet und in 4 µl Formamid/EDTA-Probenpuffer aufgenommen.

#### Gelelektrophorese im Harnstoff-Acrylamidgel

Zunächst wurden die Glasplatten mit Detergenz und Isopropanol sorgfältig entfettet und zusammengesetzt.

Für ein 5 %iges Polyacrylamidgel, welches 7 M Harnstoff enthielt, wurden 21 g Harnstoff in 8.4 ml 30 %iger Acrylamidlösung und 20 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Zu dieser Lösung wurden dann 0.5 g Amberlite gegeben und die Lösung 20 Minuten gerührt. Zum Abtrennen der Amberlite wurde das Gemisch durch einen 0.2 µm Filter filtriert und anschließend 6 ml 10 x TBE zugegeben. Nach dem Starten der Polymerisation mit 15 µl TEMED und 350 µl 10 %iger Ammoniumperoxodisulfatlösung wurde die Gellösung sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und der Kamm umgekehrt eingesetzt. Die Gelmatrix ließ man mindestens 2 h in horizontaler Lage auspolymerisieren.

10 x TBE (pH 8.3):

1 M Tris  
1 M Borsäure  
20 mM EDTA

Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Gelapparatur eingebaut, die Pufferkammern mit Laufpuffer (1 x TBE) gefüllt und die Probenaschen sorgfältig mit Laufpuffer gespült, um Harnstoff und Gelstücke zu entfernen. Vor dem Auftragen der Proben auf das Sequenzgel wurde die DNA für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Es wurden jeweils 1.5 µl Probe pro Tasche aufgetragen und dann der Lauf gestartet (Laufbedingungen 48 Watt, 8 h).

Kurz bevor die DNA-Fragmente aus der Gelmatrix herausliefen, wurde ihre Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers detektiert und die gespeicherten Daten konnten nach Beendigung der Elektrophorese mit der ABI Prism™ Sequencing Analysis Software ausgewertet werden.

## **2.5 Verfahren zur Klonierung von DNA**

### **2.5.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen**

Pro µg in Wasser oder in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 gelöste DNA setzte man 2-5 Units des entsprechenden Restriktionsenzym ein, wobei die Menge des Enzyms 10 % (v/v) des Reaktionsansatzes nicht überschreiten sollte. Es wurde der für das Restriktionsenzym von den Firmen mitgelieferte Reaktionspuffer verwendet und der Ansatz mindestens 2 h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert. Die Vollständigkeit des Restriktionsverdaus wurde in einem Agarosegel überprüft.

### **2.5.2 Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche *in vitro*, die von Saiki *et al.* (1985, 1988) entwickelt wurde. Sie

zeichnet sich durch eine schnelle und einfache Durchführung der Experimente und durch eine hohe Spezifität der Amplifikation aus. Des weiteren ermöglicht sie durch Wahl der geeigneten Primer die gezielte Einführung von Mutationen sowie die Anfügung von Restriktionsschnittstellen. Die Durchführung erfolgte nach einer Beschreibung von Innis *et al.* (1990) in einem programmierbaren Heizblock GeneAmp PCR System 2400 der Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt.

Ein PCR-Ansatz (100 µl) enthielt folgende Komponenten:

10 µl	10 x Taq-Polymerase-Puffer
10 µl	dNTP-Mix (enthält 2 mM von jedem Nukleotid)
1-10 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
8 µl	Sense-Primer (40 pmol)
8 µl	Antisense-Primer (40 pmol)
0.1-1 ng	zu amplifizierende DNA, mit Wasser auf 99.5 µl aufgefüllt
0.5 µl	Taq-DNA-Polymerase (Zugabe nach der ersten Denaturierung)

Die PCR wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

<i>Denaturierung vor dem ersten Zyklus</i>	94°C	2 sec	
<i>Denaturierung</i>	94°C	2 sec	
<i>Primeranlagerung</i>	T <sub>a</sub>	5 sec	35 Zyklen
<i>Elongation</i>	72°C	1min/kb	
<i>Nach dem letzten Zyklus</i>	72°C	2 min	

Die Anlagerungstemperatur T<sub>a</sub> der Primer schätzte man ausgehend von der Schmelztemperatur T<sub>m</sub> der Oligonukleotide ab:

$$T_a = T_m - 5 \text{ bis } 10^\circ\text{C}$$

$$T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

Nach Beendigung der PCR wurden 10 µl des Reaktionsansatzes gelelektrophoretisch analysiert. Zur Reinigung des amplifizierten DNA-Fragments wurde der verbliebene Reaktionsansatz in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und die DNA aus der Gelmatrix isoliert.

### Amplifikation der beiden für cytosolische Hsp70 codierenden cDNAs durch PCR:

Die PCR-Amplifikation der cDNAs der beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen erfolgte ausgehend von der PCR-amplifizierten, unklonierten cDNA (**2.7.2**). Folgende Komponenten wurden verwendet:

5 µl	10 x ThermoPol Reaction Buffer
5 µl	dNTP-Mix (enthält 2 mM von jedem Nukleotid)
25 pmol	Sense-Primer (1-ATG- <i>Xho</i> I bzw. 2-ATG- <i>Xho</i> I)
25 pmol	Antisense-Primer (1-EEVD- <i>Mlu</i> I bzw. 2-EEVD- <i>Mlu</i> I)
1 µl	PCR-amplifizierende, unklonierte cDNA ( <b>2.7.2</b> ) mit Wasser auf 49.7 µl aufgefüllt
0.3 µl (0.6 U)	Vent <sub>R</sub> <sup>®</sup> -DNA-Polymerase (Zugabe nach der ersten Denaturierung)

Die PCR wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

<i>Denaturierung vor dem ersten Zyklus</i>	94°C	2 sec	
<i>Denaturierung</i>	94°C	2 sec	
<i>Primeranlagerung</i>	60°C	5 sec	5 Zyklen
<i>Elongation</i>	72°C	145 sec	
<i>Denaturierung</i>	94°C	2 sec	
<i>Primeranlagerung</i>	52°C	5 sec	30 Zyklen
<i>Elongation</i>	72°C	145 sec	
<i>Nach dem letzten Zyklus</i>	72°C	2 min	

10 % des Reaktionsansatzes wurden auf einem Agarosegel analysiert (**Abb. 3.7**).

### **2.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX™ II-DNA-Extraktionskit der Fa. Qiagen, Hilden.

Hierbei wird die Gelmatrix durch Erhitzen in Gegenwart von Natriumperchlorat zerstört und die DNA durch die hohe Salzkonzentration an suspendierte Kieselgelpartikel gebunden. Alle Verunreinigungen wie Agarose, Proteine, Salze und Ethidiumbromid werden während der Waschschrte entfernt und die gereinigte DNA kann in Puffer oder Wasser aufgenommen werden.

Die Bande des zu isolierenden DNA-Fragmentes wurde auf einem langwelligen UV-Schirm (366 nm) ausgeschnitten, das Gelstück gewogen und mit den in der Produktvorschrift angege-

benen Mengen an Puffer und Kieselgelpartikelsuspension versetzt. Nach der Ausführung des Protokolls wurde die DNA mit mindestens 20 µl 5 mM Tris/HCl, pH 8.0 eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt oder in einem Agarosegel abgeschätzt.

#### **2.5.4 Dephosphorylierung von DNA**

Die Dephosphorylierung von linearisiertem Vektor wurde mit der CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) der Fa. MBI-Fermentas nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt.

#### **2.5.5 Ligation von DNA**

Die DNA-Ligase T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen in doppelsträngiger DNA zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen.

Zur Ligation wurden 50 fmol asymmetrisch linearisierter Vektor und 50-150 fmol des mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnittenen DNA-Fragments in 1 x Ligationspuffer mit 1 µl DNA-Ligase T4 (1U/µl) für 16 h bei 16°C oder für 3 h bei 25°C inkubiert.

Nach Beendigung der Ligation erfolgte die Transformation des Vektors in kompetente Zellen von *E. coli*.

#### **2.5.6 Transformation in kompetente Zellen von *E. coli***

Zur Transformation in kompetente Zellen von *E. coli* wurden 1- 10 ng DNA eines Ligationsansatzes mit 50 µl kompetenter Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (20 s, 37°C) und anschließendem Abkühlen auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 950 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt.

Die Zellen wurden nach dieser Behandlung in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agarplatten, die die benötigten Selektionsmarker enthielten, ausplattiert, und nach Inkubation für ca. 15 h bei 37°C pickte man einzelne Klone, deren Plasmid-DNA isoliert und durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen charakterisiert wurde.

Zeigten sich nach der Elektrophorese im Agarosegel die erwarteten Fragmente, so wurde zur Kontrolle der Sequenz des klonierten DNA-Fragmentes eine Sequenzierung durchgeführt .

## 2.6 Radioaktive Markierung von DNA

### 2.6.1 Markierung von dsDNA

Nach der von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode wurden in 1 µg doppelsträngiger DNA Einzelstrangbrüche mit DNase I eingeführt. Anschließend wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zum Wiederaufbau der DNA und zum Einbau radioaktiven [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTPs verwendet.

Die Markierung wurde mit dem „Nick translation system“ der Fa. Life Technologies, Eggenstein durchgeführt und erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Die radioaktiv markierte DNA wurde vor der Zugabe zur Prähybridisierungslösung 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

### 2.6.2 Markierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide markierte man am 5'-Ende unter Verwendung von T4-Polynukleotid-Kinase mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP.

Ein Markierungsansatz (50 µl) enthielt folgende Komponenten:

- 10 pmol Oligonukleotid
- 5 µl 10 x Puffer für Polynukleotid-Kinase
- 6 µl [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol)
- 6 U Polynukleotid-Kinase T4
- mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt

Der Markierungsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen bei 65°C inaktiviert. Der Ansatz wurde ohne die freie Radioaktivität abzutrennen der Prähybridisierungslösung zugesetzt.

#### Bestimmung des Einbaus von Radioaktivität

Zur Bestimmung des radioaktiven Einbaus wurden nach Durchführung der Reaktion dem Markierungsansatz zwei Aliquote von jeweils 0.5 µl entnommen und auf zwei Papierfilter (DE 81, Schleicher & Schuell, Dassel) gegeben. Einer der Filter wurde dreimal mit 0.5 M Natriumhydrogenphosphat, pH 7.4, zweimal mit Wasser, zweimal mit Ethanol und abschließend mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Den zweiten Filter ließ man unbehandelt trocknen. Von beiden Filtern bestimmte man die Cerenkov-Strahlung im Szintillationszähler und ermittelte aus der gemessenen Differenz die Einbaurate.

## **2.7 Herstellung einer cDNA-Bibliothek**

Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurde das SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Library Construction Kit der Fa. Clontech verwendet.

### **2.7.1 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Die Erststrangsynthese erfolgte ausgehend von 1.58 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA, die aus 2 Tage alten Gurkenkotyledonen isoliert worden war. Es wurde die Superscript<sup>TM</sup> II Reverse Transkriptase der Fa. Lifetechnologies verwendet.

### **2.7.2 Amplifikation der Einzelstrang-cDNA durch PCR**

Die PCR-Amplifikation der Einzelstrang-cDNA erfolgte ausgehend von 2 µl der cDNA-Synthese-Reaktion in 21 Zyklen nach Anweisung des Herstellers. 5 µl des Reaktionsansatzes (100 µl) wurden auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

### **2.7.3 Adaptorligation und Größenfraktionierung**

Die Behandlung der amplifizierten cDNA mit Proteinase K und DNA-Polymerase T4 erfolgte nach Vorschrift des Herstellers, genauso wie die anschließende Adaptorligation, die Phosphorylierung der Adaptor-ligierten cDNA und die Größenfraktionierung.

### **2.7.4 Ligation und Transformation**

Für die Ligation der cDNA in den mit *Eco* RI linearisierten und dephosphorylierten Vektor pT7T3-18U (Fa. Pharmacia) wurde cDNA aus den ersten vier Fraktionen der Größenfraktionierung verwendet. Die cDNA wurde nach Anleitung des Herstellers durch Ethanol-Fällung ankonzentriert und in 5 µl Wasser aufgenommen. Die Ligation erfolgte in drei verschiedenen Ansätzen für 20 h bei 16°C, wobei verschiedene Mengenverhältnisse zwischen Vektor und cDNA verwendet wurden. Jeweils 10 % eines Ligationsansatzes (0.5 µl) wurden zur Transformation in ultra-kompetente Zellen des Stammes Epicurian Coli<sup>®</sup> XL2-Blue (Fa. Stratagene) nach Vorschrift des Herstellers verwendet.



Zur Ermittlung der Transformationseffizienz und der Menge an Klonen mit cDNA-Insert wurden Aliquote von 1-10 µl auf LB/Amp/X-GAL/IPTG-Agarplatten ausplattiert. Nach ausreichend langer Inkubation der Bakterien bei 4°C (ca. 30 h) wurde das Verhältnis von Klonen mit Blaufärbung, zu Kolonien, wo keine Blaufärbung festgestellt werden konnte, ermittelt. Ligationsansätze mit günstigem Blau/Weiß-Verhältnis wurden in der entsprechenden Verdünnung auf Masterplatten ausplattiert.

### 2.7.5 Herstellung von Master- und Replikafiltern

Es wurden 26 Masterfilter (Durchmesser 150 mm) mit jeweils ca. 7500 Klonen hergestellt, was einer Gesamtzahl von ca. 195000 Klonen entspricht. Aus dem Blau-Weiß-Screening war der Anteil von Klonen mit cDNA-Insert ermittelt worden, so daß bei einer recht pessimistischen Abschätzung mindestens 90000 Klone mit cDNA-Insert in der Bibliothek enthalten sein sollten. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten nach einer Methode von Vogeli und Kaytes (1987) von dem Nitrocellulosefilter zwei Replikafilter angefertigt werden. Hierzu wurde der Nitrocellulosefilter mit den Bakterienkolonien auf mehrere Lagen Whatman 3MM Papier gelegt, und auf diesen wurde bündig eine frische Nitrocellulosemembran gelegt, die zuvor auf einer LB-Agarplatte angefeuchtet worden war. Die beiden Filter wurden vorsichtig mit mehreren Lagen Whatman 3MM Papier bedeckt und zwischen zwei Glasplatten gleichmäßig andrückt, um einen Teil der Bakterienkolonien auf den frischen Filter zu übertragen. Mit einer sterilen Kanüle wurde die Lage der beiden Filter zueinander durch drei asymmetrische Einstiche am Rand markiert und der Replikafilter mit den Kolonien nach oben auf einer LB-Agarplatte mit den entsprechenden Selektionsmarkern für ca 5 h bei 37°C inkubiert, bis deutlich sichtbare Kolonien gewachsen waren. Ein zweiter Replikafilter wurde analog unter Berücksichtigung der Markierungen angefertigt.

Der Filter, von dem die Replikafilter erstellt worden waren, wurde zur Regeneration 1 h bei 37°C inkubiert und auf LB/Amp-Agarplatten mit 20 % (v/v) Glycerin bei -20°C gelagert.

Die Replikafilter unterzog man einer Behandlung zur Lyse der Bakterien, um die DNA auf der Nitrocellulosemembran zu fixieren. Hierzu tränkte man je zwei Lagen Whatman 3MM Papier mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und 20 x SSPE.

#### Denaturierungspuffer:

0.5 M NaOH  
1.5 M NaCl

#### Neutralisierungspuffer:

1.0 M Tris/HCl, pH 7.0  
1.5 M NaCl

#### 20 x SSPE:

3.6 M NaCl  
20 mM EDTA  
0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH,  
pH 7.7

Die Replikafilter wurden zunächst 10 Minuten auf dem mit Denaturierungspuffer getränkten Papier denaturiert, 5 Minuten getrocknet und anschließend zweimal jeweils 5 Minuten auf

dem mit Neutralisierungspuffer getränkten Papier inkubiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf dem mit 20 x SSPE getränkten Papier ließ man die Replikafilter an der Luft trocknen.

Zum Fixieren der DNA an die Nitrocellulosemembran wurden die Filter zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Papier für 1 h bei 80°C in einem Vakuumtrockenschrank erhitzt.

Anschließend wurden die Replikafilter über Nacht bei 50°C in Waschpuffer (45 mM Natriumcitrat, 450 mM NaCl, 0.1 % (w/v) SDS) geschwenkt, um Reste von Bakterien von der Membran zu entfernen. Hängengebliebene Bakterienreste konnten vorsichtig abgeschabt werden. Nachdem die Filter getrocknet waren, konnten sie zur Hybridisierung eingesetzt werden.

### 2.7.6 Koloniehybridisierung

Das „Screening“ der cDNA-Bank erfolgte durch Nukleinsäurehybridisierung der Replikafilter. Um freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran abzusättigen, wurden diese mit Prähybridisierungslösung für 2-16 h bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur inkubiert. Anschließend gab man zu der Prähybridisierungslösung eine mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierte DNA- oder Oligonukleotid-Sonde und hybridisierte bei der gewünschten Temperatur über Nacht. Die Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung und die Hybridisierungstemperatur hingen von der verwendeten Sonde ab.

Benötigte Lösungen:

#### 50 x Denhardt's:

10 g/l Ficoll  
10 g/l Polyviylpyrrolidon,  $M_r$  25000  
10 g/l BSA

#### 20 x SSPE:

0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7.7  
3.6 M NaCl  
20 mM EDTA

### Hybridisierung mit einem synthetischen Oligonukleotid

#### Prähybridisierungslösung:

10 x Denhardt's  
5 x SSPE  
1.0 % (w/v) SDS  
100 µg denaturierte DNA aus Heringssperma

Die Hybridisierungstemperatur wählte man 10-15°C unterhalb der Schmelztemperatur  $T_m$  des Oligonukleotids, die sich anhand folgender Gleichung abschätzen ließ:

$$T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

### Hybridisierung mit einem homologen DNA-Fragment

#### Prähybridisierungslösung:

50 % (v/v) Formamid  
10 x Denhardt's  
5 x SSPE  
0.1 % (w/v) SDS  
100 µg/ml denaturierte DNA aus Heringssperma

Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C.

Nach der Hybridisierung wurden die Nitrocellulosefilter gewaschen, wobei die Waschbedingungen der jeweiligen Probe angepasst wurden. Eine Erhöhung der Waschtemperatur und/oder eine Erniedrigung der Salzkonzentration im Waschpuffer (= stringenteres Waschen) führten zu spezifischeren Hybridisierungssignalen.

#### Waschpuffer:

300 mM NaCl  
30 mM Natriumcitrat  
0.1 % (w/v) SDS

In der Regel wurde zweimal bei der Hybridisierungstemperatur oder bei Raumtemperatur für 10 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen trocknete man die Membran an der Luft, schlug sie in Frischhaltefolie ein und fertigte eine Autoradiographie an. Klone, die auf den Autoradiographien beider Replikafilter positive Hybridisierungssignale zeigten, wurden mit einem sterilen Zahnstocher von dem Masterfilter abgenommen und über Nacht in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektionsmarkern angezogen.

Sollte eine Membran mehrfach für Hybridisierungen eingesetzt werden, behandelte man die Filter zweimal mit kochender 0.1 %iger SDS-Lösung. Danach konnten die Filter erneut hybridisiert werden.

## **2.8 gekoppelte Transkription und Translation in vitro**

Die Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen erfolgte mit dem TNT<sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate System der Fa. Promega nach Anweisung des Herstellers. Hierbei können von Plasmiden, deren cDNA-Insert unter Kontrolle des Promotors der RNA-Polymerase T7 steht, durch gekoppelte Transkription/Translation in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markierte Proteine erhalten werden.

### 2.8.1 Aufarbeitung der Translationsansätze für Wechselwirkungsexperimente

Zur Verwendung der radioaktiv markierten Proteine für Wechselwirkungsexperimente wurden die Translationsansätze über eine Nick Spin Column (Fa. Pharmacia) in Bindungspuffer umpuffert. Hierzu wurden bis zu 150 µl eines Translationsansatzes auf die Säule aufgetragen und durch Zentrifugation bei 600 x g in Bindungspuffer eluiert.

## 2.9 Bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

Zur Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli* wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet. Einerseits wurde das Expressionssystem „QIAexpress“ der Fa. Qiagen verwendet. Dieses System sieht die Klonierung der DNA in sogenannte pQE-Vektoren vor, wodurch dem rekombinanten Protein amino- oder carboxyterminal eine Sequenz von sechs Histidinresten angefügt wird. Mit diesem 6xHis-Tag ist eine schnelle Reinigung des exprimierten Proteins über Affinitätschromatographie an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose möglich (Hochuli, 1990).

Bei dem anderen System handelt es sich um sogenannte pGEX-Vektoren der Fa. Pharmacia. Hierbei wird ein Fusionsprotein zwischen dem C-Terminus der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* und dem N-Terminus des zu exprimierenden Proteins hergestellt. Dieses System bietet den Vorteil, daß aufgrund der Größe des verwendeten Tags (ca. 26 kDa) die Bildung von Proteinen in unlöslicher Form während der bakteriellen Expression, sogenannten inclusion bodies, seltener vorkommt, als bei der Verwendung des stark geladenen His-Tags. Die Reinigung des GST-Fusionsproteins erfolgte über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose (Guan und Dixon, 1991; Simons und Vander Jagt, 1977).

### 2.9.1 Herstellung des Expressionsvektors

Die beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 aus Gurke wurden als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* hergestellt. Hierzu wurden beide cDNAs aus dem Vektor pCI durch Verdau mit *Xho* I und *Not* I isoliert und über die selben Schnittstellen im korrekten Leseraster in den Vektor pGEX-5x-1 kloniert. Hierdurch entsteht bei der bakteriellen Expression ein Fusionsprotein zwischen dem C-Terminus der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* und dem N-Terminus des Hsp70.

Die Transformation erfolgte in kompetente Zellen des Stammes *E. coli* M15[pREP4]. Positive Transformanten wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) selektioniert.

## **2.9.2 Expression von Fusionsproteinen**

Positive Transformanten zog man in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) an.

### **2.9.2.1 Expression der GST-Hsp70-Fusionsproteine**

Im präparativen Maßstab wurden 1000 ml Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 1.0$  bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde bei 23°C durch Zusatz von 0.2 mM IPTG induziert und man inkubierte weitere 5 h bei 23°C. Zur Kontrolle der Expression wurden in regelmäßigen Abständen Proben präpariert, indem man 500 µl der Zellkulturen abzentrifugierte (10000 x g, 5 Minuten), das Pellet in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendierte und 5 µl dieser Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysierte.

### **2.9.2.2 Expression der DnaJ-Proteine**

Im präparativen Maßstab wurden 500 ml Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0.6$  bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert und man inkubierte weitere 5 h bei 37°C.

## **2.9.3 Aufarbeitung und Reinigung von Fusionsproteinen**

Zur Beendigung der Expression zentrifugierte man die Zellkultur 10 Minuten bei 5000 x g und resuspendierte das Bakterienpellet anschließend im entsprechenden Aufschlußpuffer.

### **2.9.3.1 Aufarbeitung und Reinigung der GST-Hsp70-Fusionsproteine**

Das Bakterienpellet einer Expression wurde in 1 ml Aufschlußpuffer pro Gramm Zellen resuspendiert und durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

Aufschlußpuffer:

8 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7.5  
1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
137 mM NaCl  
3 mM KCl  
2 mM  $\text{MgCl}_2$   
2 mM 2-Mercaptoethanol

1 Tablette Complete<sup>™</sup>-Protease-Inhibitoren (Fa. Boehringer) pro 10 ml Puffer

Die Behandlung mit Ultraschall erfolgte fünfmal für je 5 s im Eiswasserbad, wobei man zwischendurch 2 Minuten abkühlen ließ. Anschließend zentrifugierte man Zelltrümmer und unlösliche Proteinaggregate für 30 Minuten bei 10000 x g ab. Der klarzentrifugierte Überstand wurde für 16 h bei 4°C mit 7 mg GSH-Agarose pro Gramm aufgeschlossene Zellen inkubiert. Die GSH-Agarose war zuvor mit 1 ml Aufschlußpuffer ohne Proteaseinhibitoren pro mg Affinitätsmaterial gewaschen worden war.

Zur Reinigung der immobilisierten Fusionsproteine wurde die GSH-Agarose mit 40 Säulenvolumen Aufschlußpuffer, 20 Säulenvolumen Aufschlußpuffer mit 2 mM ATP, 40 Säulenvolumen Waschpuffer und 20 Säulenvolumen Aufschlußpuffer gewaschen.

Waschpuffer:

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7.8  
300 mM NaCl  
2 mM 2-Mercaptoethanol

Die Elution der Fusionsproteine erfolgte mit Aufschlußpuffer mit 50 mM reduziertem Glutathion. Die Waschschritte und die Elution erfolgten jeweils mit Aufschlußpuffer ohne Proteaseinhibitoren. Die eluierten Fusionsproteine wurden anschließend mit einer PD10-Säule (Fa. Pharmacia) in Bindungspuffer überführt.

Bindungspuffer:

10 mM HEPES/KOH, pH 7.2  
150 mM KCl  
3 mM  $\text{MgCl}_2$

**2.9.3.2 Aufarbeitung und Reinigung der DnaJ-Proteine**

Das Bakterienpellet einer Expression wurde in 1 ml Aufschlußpuffer pro Gramm Zellen resuspendiert und durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

Aufschlußpuffer:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7.8

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

Die Behandlung mit Ultraschall erfolgte fünfmal für je 5 s im Eiswasserbad, wobei man zwischendurch 2 Minuten abkühlen ließ. Anschließend zentrifugierte man Zelltrümmer und unlösliche Proteinaggregate für 30 Minuten bei 10000 x g ab. Die mit einem His-Tag versehenen Fusionsproteine wurden an TALON<sup>™</sup> Spin-Säulen (Fa. Clontech) gereinigt und in Bindungspuffer überführt. Die Bindung an das Affinitätsmaterial erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Säulchen sechsmal mit je 1 ml Aufschlußpuffer gewaschen, bevor mit Aufschlußpuffer mit 250 mM Imidazol eluiert wurde. Die Reinheit der umgepufferten Fusionsproteine wurde gelelektrophoretisch analysiert.

**2.10 Analyse von Proteinen**

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Hierbei entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1 cm Schichtdicke ungefähr einer Konzentration von 1 mg/ml (Harlow und Lane, 1988 S. 673).

Wenn zusätzlich noch die Absorption bei 260 nm gemessen wird, kann mit Hilfe folgender Gleichung die Proteinkonzentration berechnet werden (Wollny, 1991):

$$1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260} = \text{Proteinkonzentration in mg/ml.}$$

**2.10.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wird durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine das Absorptionsmaximum von 495 nm zu 595 nm verschoben. Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem Farbreagenz der Fa Bio-Rad nach dem Microassay-Protokoll (1-20 µg) des Herstellers.

**2.10.2 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Proteinbestimmung nach Lowry erfolgte nach einer modifizierten Methode von Polacheck und Cabib (1981).

### 2.10.3 Säuredenaturierung von Proteinen

Proteinproben wurden in 7.5 % (w/v) TCA für 30-60 Minuten auf Eis gefällt, abzentrifugiert (10000 x g, 30 min, 4°C) und das Pellet mit eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Proteine in SDS-Probenpuffer aufgenommen und im kochenden Wasserbad für 5 Minuten erhitzt.

#### SDS-Probenpuffer:

62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8  
 10 % (w/v) Saccharose  
 4 % (w/v) SDS  
 4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol  
 0.002 % (w/v) Bromphenolblau

### 2.10.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen erfolgte nach einer Methode von Laemmli (1970) in einer vertikalen Gelapparatur.

Zur Herstellung der Gelmatrix wurde eine wäßrige Lösung aus 30 % (w/v) Acrylamid mit 0.8 % (w/v) N,N'-Methylen-diacrylamid verwendet (Rotiphorese Gel 30, Fa. Roth, Karlsruhe). Das Gelsystem bestand aus einem Sammelgel (4 % (w/v) Acrylamid, pH 6.8) und einem Trenngel (pH 8.8), welches je nach Aufgabenstellung 9-15 % (w/v) Acrylamid enthielt:

<u>Gelzusammensetzung:</u>	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
Acrylamid in % (w/v)	4	9-15
Puffer	125 mM Tris/HCl, pH 6.8	375 mM Tris/HCl, pH 8.8 10 % (w/v) Saccharose
SDS in % (w/v)	0.1	0.1
<u>Polymerisationsstarter:</u>		
TEMED in % (v/v)	0.001	0.001
Ammoniumperoxo- disulfat in % (w/v)	0.1	0.05

Proteinproben wurden entweder direkt mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt, oder wenn die Proteinkonzentration der Lösung zu gering war, wurden die Proteine in



7.5 % (w/v) TCA gefällt, durch Zentrifugation (10000 x g, 30 Minuten, 4°C) pelletiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

SDS-Probenpuffer:

62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8  
10 % (w/v) Saccharose  
4 % (w/v) SDS  
4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol  
0.002 % (w/v) Bromphenolblau

Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (10000 x g, 5 Minuten) und auf die mit Elektrodenpuffer überschichtete Gelmatrix aufgetragen.

Elektrodenpuffer:

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0.1 % (w/v) SDS

Die Elektrophorese führte man je nach Gelgröße bei konstanten Stromstärken von 15 bis 35 mA durch.

Als Längenstandard wurde ein Molmarker der Fa. Life Technologies, Eggenstein verwendet.

Masse der Fragmente in kDa:

10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 200.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine entweder zur Durchführung einer Immunanfärbung auf Nitrocellulose transferiert oder aber direkt mit Coomassie Blue angefärbt.

### **2.10.5 2-dimensionale Gelelektrophorese**

Die isoelektrische Fokussierung wurde nach einer Arbeitsvorschrift von O'Farrel (1975) durchgeführt.

In Glasröhrchen von 18 cm Länge mit einem Innendurchmesser von 1.0 mm wurden 6.5 %ige (w/v) Polyacrylamidgele gegossen, die folgende Zusammensetzung hatten:

Standard-Ansatz:

1.86 ml Acrylamid/Diacrylamid-Lösung (Verhältnis 28.38 % / 1.62 %)  
2.8 ml 10 % (v/v) NP40  
2.76 ml Wasser, bidest.  
7.7 g Harnstoff  
0.14 ml Ampholyte, pH 5-7  
0.56 ml Ampholyte, pH 3-10  
14 µl TEMED  
21.8 µl 10 % (w/v) APS

Während der Polymerisation wurde die Gelmatrix mit 50 µl wäßriger Harnstofflösung (9.5 M) überschichtet.

Die zu fokussierenden Proben wurden mit dem doppelten Volumen Auftragspuffer versetzt, vor dem Auftragen auf die Gelmatrix abzentrifugiert (10000 x g, 5 Minuten) und vorsichtig mit Überschichtungslösung bedeckt.

Auftragspuffer:

8.6 M Harnstoff  
4 % (w/v) DTT  
2 % (v/v) NP40  
1.44 % (v/v) Ampholyte, pH 5-7  
0.48 % (v/v) Ampholyte, pH 3-10  
0.025 % (w/v) PMSF

Überschichtungslösung:

0.5 M Harnstoff  
0.77 % (w/v) DTT  
0.2 % (v/v) NP40  
0.25 % (v/v) Ampholyte, pH 3-10

Als Kathodenpuffer wurde eine 100 mM NaOH-Lösung und als Anodenpuffer 10 mM Phosphorsäure verwendet. Die Fokussierung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 400 V für 13 h, gefolgt von 55 Minuten bei 600 V, bei einer konstanter Temperatur von 19°C.

Um ein Zerreißen der Gelmatrix beim Herausdrücken aus dem Glasröhrchen zu verhindern, wurden die Proben nach Abschluß der isoelektrische Fokussierung bei -20°C eingefroren, mit Hilfe eines Föns aufgetaut und mit Wasser aus dem Glasröhrchen herausgedrückt.

Zur Analyse der fokussierten Proteine in der zweiten Dimension wurde die herausgedrückte Gelmatrix 45 Minuten bei Raumtemperatur in Äquillibrierlösung inkubiert.

Äquillibrierlösung:

0.5 M Tris/HCl, pH 6.8  
10 % (v/v) Glycerin  
2.3 % (w/v) SDS  
0.77 % (w/v) DTT  
0.05 % (w/v) Bromphenolblau

Anschließend wurde das Fokussierungsgel mit SDS-Agarose luftblasenfrei auf das Sammelgel eines SDS-Polyacrylamidgels aufgebracht und die fokussierten Proteine in der zweiten Dimension aufgetrennt.

SDS-Agarose:

0.5 M Tris/HCl, pH 6.8  
2.3 % (w/v) SDS  
1.0 % (w/v) Agarose  
0.77 % (w/v) DTT

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine zur Durchführung einer Immunanfärbung auf Nitrocellulose transferiert.

### 2.10.6 Proteinfärbung

Proteinfärbung mit Coomassie Blue:

Zunächst wurde das Gel 5 Minuten in Entfärber gewaschen und zum Färben 30 Minuten in Färbelösung geschwenkt.

Entfärber:

28 % (v/v) 2-Propanol  
5 % (v/v) Eisessig

Färbelösung:

50 % (v/v) Methanol  
5 % (v/v) Eisessig  
0.002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Anschließend wurde kurz gewässert und der Hintergrund mit Entfärber ausgewaschen.

### 2.10.7 Detektion von radioaktiv markierten Proteinen

Die mit Coomassie Blue gefärbte Gelmatrix wurde 20 Minuten in Amplify™-Lösung geschwenkt und auf einem beheizbaren Gelrockner im Vakuum auf Filterpapier fixiert. Das so behandelte Gel wurde entweder mit Röntgenfilm oder mit einer Imagerplatte bei Raumtemperatur exponiert.

Die Imagerplatte wurde in einem Bio-Imager Fujifilm BAS-1000 ausgelesen und die erhaltenen Rohdaten mit dem Programm TINA™-PC-BAS (Version 2.09e) der Fa. raytest, Straubenhardt bearbeitet.

## 2.11 Immunologische Verfahren

### 2.11.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western-Blot)

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch ein Halbtrockenblot-Verfahren auf Nitrocellulose transferiert (Kyhse-Anderson, 1984).

Für den Transfer wurden auf die Graphitanode sechs Filter (Whatman 3 MM) gelegt, welche zuvor in Puffer I getränkt worden waren. Darauf legte man drei in Puffer II getränkte Filter. Die in Puffer II befeuchtete Nitrocellulose und das SDS-Polyacrylamidgel wurden luftblasenfrei darübergerlegt und mit neun Filtern, die in Puffer III getränkt worden waren bedeckt

<u>Puffer I:</u>	<u>Puffer II:</u>	<u>Puffer III:</u>
300 mM Tris/HCl, pH 10.4	25 mM Tris/HCl, pH 10.4	25 mM Tris/HCl, pH 9.4
20 % (v/v) Methanol	20 % (v/v) Methanol	20 % (v/v) Methanol
		40 mM $\gamma$ -Aminocaprinsäure

Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von  $0.8 \text{ mA/cm}^2$  für 1 h. Nach dem Transfer färbte man die Proteine mit Färbelösung an, entfärbt den Hintergrund mit Wasser und der Längensstandard wurde mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet.

#### Färbelösung:

0.1 % (v/v) Tinte Königsblau  
1 % (v/v) Essigsäure

Durch 10minütiges Schwenken der Membran in 0.2 M Natronlauge wurden die Proteinbanden vollständig entfernt und abschließend die Nitrocellulose kurz in Wasser gewaschen.

### 2.11.2 Immunanfärbung

Zur Durchführung einer Immunanfärbung inkubierte man die entfärbte Nitrocellulosemembran, auf die die Proteine transferiert worden waren, mindestens 1 h, meistens jedoch über Nacht bei Raumtemperatur in Blockpuffer, um freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose abzusättigen.

#### Blockpuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7.5  
50 mM NaCl  
5 % (w/v) BSA

#### Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7.5  
50 mM NaCl

Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 Minuten in ca. 150 ml Waschpuffer geschwenkt, bevor man mit einer Verdünnung des Erstantikörpers in 10-20 ml Blockpuffer (je nach verwendetem Antikörper entweder 1:1000 oder 1:5000) für 1 h auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubierte. Danach folgten fünf Waschschrte, wobei jeweils ca. 150-200 ml Lösung verwendet wurden. Es wurde zweimal 5-10 Minuten mit Waschpuffer, zweimal 10 Minuten mit Waschpuffer mit 0.05 % (v/v) NP40 und abschließend nochmals 10 Minuten mit Waschpuffer ohne 0.05 % (v/v) NP40 bei Raumtemperatur geschwenkt.

Die Detektion des Erstantikörpers erfolgt mit Zweitantikörpern gegen Kaninchen- oder Maus-Immunglobuline, an die zwei verschiedene Enzymkonjugate gekoppelt waren. Es wurde entweder mit einem Enzymkonjugat mit Alkalischer Phosphatase (AP-gekoppelter Zweitantikörper) oder mit Meerrettichperoxidase (HRP-gekoppelter Zweitantikörper) gearbeitet. Die Nitrocellulose wurde 1 h bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung des Zweitantikörpers von 1:1000 oder 1:5000 in 10-20 ml Blockpuffer auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die gleichen Waschschrte wie nach der Inkubation mit dem Erstantikörper durchgeführt.

Die Detektion des Zweitantikörpers mit dem Enzymkonjugat der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch eine Farbreaktion auf der Nitrocellulosemembran, indem man mit 10-20 ml Färbelösung inkubierte und mit 1 %iger Natriumazidlösung abstoppte.

#### Färbelösung:

10 ml Färbepuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>)  
66 µl NBT (10 % Nitroblautetrazolium in 70 % DMF)  
33 µl BCIP (5 % 5-Bromo-4-chloro-indoxylphosphat in DMF)

Die Detektion beim HRP-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte mit Hilfe des ECL™ Western-Blotting Systems (Amersham, Braunschweig). In Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion), wobei die freiwerdende Energie in Form von Licht mit einem Wellenlängenmaximum bei 428 nm emittiert wird. Die Anwesenheit von Phenolen bewirkt eine Verstärkung der Chemilumineszenz, wodurch eine Detektion mit einem blaulicht-sensitiven Film (Hyperfilm™ ECL) möglich wird. Die Nitrocellulosemembran wurde zur Detektion mit einer Mischung an gleichen Volumina der beiden Detektionslösungen bedeckt, 1 Minute inkubiert, die Lösung möglichst vollständig abgegossen und die Membran in durchsichtige Plastikfolie eingeschlagen. Je nach Intensität des emittierten Lichtes wurde die Membran zwischen 5 und 180 Sekunden mit einem Film bedeckt und anschließend sofort entwickelt.

Da beim ECL-System, im Gegensatz zur Anfärbung mit der Alkalischen Phosphatase, keine Farbreaktion auf der Membran stattfindet, konnte bei dieser Detektionsmethode mehrmals mit

unterschiedlichen Erstantikörpern inkubiert werden. Hierzu wurde die Membran nach der Detektion 30 Minuten bei 50°C in Stripping-Puffer geschwenkt, um alle Antikörperkomplexe zu zerstören. Anschließend inkubierte man dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer, bevor eine erneute Immunanfärbung durchgeführt wurde.

Stripping-Puffer:

Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl)  
100 mM 2-Mercaptoethanol  
2 % (w/v) SDS

## **2.12 Zellfraktionierung von *Cucumis sativus***

### **2.12.1 Aufarbeitung von Gurkenkotyledonen**

Der Aufschluß des Pflanzenmaterials und alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Die frisch geernteten Kotyledonen wurden mit 0.5-1 ml Aufschlußmedium pro Gramm Pflanzenmaterial versetzt und in einem auf -20°C vorgekühlten Hackblock, der sich auf Eis befand, mit einer Rasierklinge 45 Minuten bis zur Homogenität gehackt. Bei größeren Mengen über 10 g Kotyledonen erfolgte der Aufschluß in einem Waring-Blender (6 x 5 s auf höchster Stufe).

Aufschlußmedium:

50 mM HEPES/KOH, pH 7.5  
20 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
2.5 mM DTT  
0.5 mM EDTA  
15 % (w/w) Saccharose

Das so erhaltene Rohhomogenat wurde durch zwei Lagen Miracloth abgepreßt und zweimal bei 2000 x g (4000 rpm, Rotor JA20) für 15 Minuten einer Vorzentrifugation unterworfen. Der daraus erhaltene Überstand wurde 30 Minuten bei 12000 x g (10000 rpm, Rotor JA20) zentrifugiert, wobei im Pellet Organellen wie Glyoxysomen und Mitochondrien, aber auch noch Etioplasten enthalten waren.

Präparation von Glyoxysomen:

Das Pellet der Zentrifugation bei 12000 x g wurde zur Präparation von Glyoxysomen mit einem feinen Pinsel in 3-4 ml Gradientenpuffer vorsichtig resuspendiert.

Gradientenpuffer:

50 mM HEPES/KOH, pH 7.5  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.5 mM EDTA  
15 % (w/w) Saccharose

Die Organellensuspension wurde vorsichtig auf einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (8 ml 28 % (w/w) Saccharose, 10 ml 38 % (w/w) Saccharose, 12 ml 48 % (w/w) Saccharose, 5 ml 58 % (w/w) Saccharose) aufgetragen und für 2 h bei 25000 rpm (Rotor TST 28.3) eine Gleichgewichtsdichtezentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Spinco L2-65B, Fa. Beckmann, München oder Centrikon T-2060, Fa. Kontron, Eching) durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde der obere Teil des Gradienten mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und dann die unterste Bande bei einer Saccharosekonzentration zwischen 48 und 58 % (w/w) Saccharose, in der sich die aufgereinigten Glyoxysomen befanden, vorsichtig mit einer Pipette herausgezogen.

**2.12.2 Subfraktionierung von Glyoxysomen**

Die über Saccharosedichtegradienten gereinigten Glyoxysomen wurden in Matrixproteine, periphere Membranproteine und integrale Membranproteine subfraktioniert. Hierzu wurden 6 ml der Glyoxysomenfraktion aus dem Saccharosedichtegradienten mit dem gleichen Volumen an Wasser versetzt und 45 Minuten auf Eis gerührt. Die Lösung wurde 40 Minuten bei 35000 rpm zentrifugiert (TH641-Rotor) und die Matrixproteine aus dem Überstand mit TCA präzipitiert. Das Pellet der Glyoxysomenmembranen wurde in 4 ml Aufschlußmedium mit 200 mM KCl resuspendiert, 40 Minuten bei 8°C geschüttelt und 30 Minuten bei 38000 rpm zentrifugiert (Sw60-Rotor). Der hierbei erhaltene Überstand mit den peripheren Membranproteinen wurde mit TCA präzipitiert und die integralen Membranproteine mit Extraktionspuffer aus den Glyoxysomenmembranen solubilisiert.

Extraktionspuffer:

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7.0  
300 mM NaCl  
20 % (v/v) Glycerin  
4 % (w/v) SDS  
5 % (v/v) Triton TX-100  
4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

### 2.13 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und DnaJ-Proteinen

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und DnaJ-Proteinen wurden an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose affinitätsgereinigte DnaJ-Proteine entweder mit radioaktiv markierten Proteinen oder mit GST-Fusionsproteinen inkubiert (Minami *et al.*, 1996). Sowohl die in Bindungspuffer überführten radioaktiv markierten Proteine als auch die gereinigten GST-Fusionsproteine wurden vor dem Bindungsexperiment mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose für 2 Minuten auf Eis vorinkubiert (Höfeld *et al.*, 1995). Die Suspension wurde abzentrifugiert und die Überstände für die Wechselwirkungsexperimente verwendet.

Die DnaJ-Proteine wurden mit den verschiedenen Hsp70-Isoformen in Anwesenheit von 2 mM ADP oder ATP in Bindungspuffer für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

#### Bindungspuffer:

10 mM HEPES/KOH, pH 7.2  
150 mM KCl  
3 mM  $\text{MgCl}_2$

Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (1000 x g, 4°C) wurden die Überstände zu 20 µl  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose pipettiert und 20 Minuten bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Affinitätsmaterial mit 6 ml Waschpuffer mit 2 mM ADP bzw. ATP gewaschen, die gebundenen Proteine mit 250 Imidazol eluiert und nach SDS-Page entweder auf Nitrocellulose transferiert oder, im Falle der radioaktiv markierten Proteine, das Gel getrocknet und eine Autoradiographie angefertigt.

#### Waschpuffer:

50 mM HEPES/KOH, pH 7.5  
300 mM NaCl  
3 mM  $\text{MgCl}_2$

Die Immunanfärbung erfolgte mit Antiseren gegen die DnaJ-Proteine und mit Antiserum gegen cytosolische Hsp70.

### 2.14 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und Glyoxysomen

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und Glyoxysomen wurden 48 g etioliert angekeimte Kotyledonen (4 d) aufgearbeitet. Das bei der Aufarbeitung der Gurkenkotyledonen erhaltene Filtrat des Rohhomogenates wurde zweimal bei 2000 x g (4000



rpm, Rotor JA20) für 15 Minuten einer Vorzentrifugation unterworfen. Der daraus erhaltene Überstand wurde 30 Minuten bei 12000 x g (10000 rpm, Rotor JA20) zentrifugiert und das Pellet in 2.4 ml Bindungspuffer mit 14 % (w/w) Saccharose mit einem Pinsel vorsichtig resuspendiert.

Bindungspuffer mit 14 % (w/w) Saccharose:

10 mM HEPES/KOH, pH 7.2

150 mM KCl

3 mM MgCl<sub>2</sub>

14 % (w/w) Saccharose

500 µl des resuspendierten 12000 x g Pellets wurden mit jeweils gleichen Mengen an radioaktiv markiertem Hsp70 in Bindungspuffer (7 µl cytHsp70-1, 13 µl cytHsp70-2, 30 µl cpHsp70, 20 µl BiP-Hsp70) versetzt und die Suspension auf 2 mM ADP bzw. ATP eingestellt. Die radioaktiv markierten Hsp70 waren nach einer Zentrifugation bei 100000 x g in der Airfuge für 1 h über NICK<sup>®</sup> Spin Columns (Fa. Pharmacia Biotech) in Bindungspuffer überführt worden, wodurch auch gleichzeitig das ATP-Regenerationssystem des Retikulozytenlysats inaktiviert wurde (Abtrennen des Creatinphosphates).

Die Suspensionen mit den Hsp70-Isoformen wurden anschließend auf verschiedene diskontinuierliche Saccharosedichtegradienten in Gradientenpuffer aufgegeben (2.5 ml 28 % (w/w) Saccharose, 2.5 ml 38 % (w/w) Saccharose, 5 ml 48 % (w/w) Saccharose, 1.5 ml 58 % (w/w) Saccharose) und 2 h bei 30000 rpm (Rotor TH 641) zentrifugiert.

Gradientenpuffer:

50 mM HEPES/KOH, pH 7.5

5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.5 mM EDTA

2 mM ADP bzw. ATP

Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten entweder an einem Gradienten-Fraktionierer ausgepumpt oder die Fraktion der Glyoxysomen direkt aus dem Gradienten entnommen. Gleiche Mengen (5 µl) der einzelnen Fraktionen wurden zur SDS-Page eingesetzt, das Gel nach der Elektrophorese getrocknet und die Menge des cosedimentierten Hsp70 durch Exposition mit einer Imagerplatte ermittelt.

## 2.15 Messung der ATPase-Aktivität von Hsp70

Die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 wurde bei 37°C in 36 µl-Reaktionsansätzen bestimmt (O'Brien und McKay, 1995). Hierzu wurde die bakteriell exprimierte und gereinigte Hsp70-Fusionsprotein in einer Konzentration von 1 µM entweder mit oder ohne bakteriell exprimiertem und gereinigtem DnaJ-Protein (2 µM) in Bindungspuffer inkubiert.

### Bindungspuffer:

10 mM HEPES/KOH, pH 7.2  
150 mM KCl  
3 mM MgCl<sub>2</sub>

Durch Zugabe von 0.43 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol, Fa. Amersham), welches einer Konzentration von 40 nM entsprach (single turnover conditions), wurde die Reaktion gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 3 µl dem Reaktionsansatz entnommen, mit dem gleichen Volumen 18 % (w/v) TCA versetzt und anschließend sofort neutralisiert.

### 2.15.1 Dünnschichtchromatographie von radioaktiv markierten Nukleotiden

Von der gestoppten Reaktion der ATPase-Messung wurden jeweils 0.4 µl auf einer Polyethylenimincellulose-DC-Platte (Fa. Merck) aufgetragen. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus 1 M Ameisensäure und 0.5 M LiCl verwendet (O'Brien und McKay, 1993). Nach beendeter Chromatographie wurden die Platten getrocknet und die Bildung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ADP mit einer Bioimager-Platte detektiert.

### 3 Ergebnisse

Der Transport kerncodierter Vorläuferproteine über die Organellen-Membran in Peroxisomen ist an die Hydrolyse von ATP gekoppelt (Olsen, 1998). Die Notwendigkeit von Proteinen der Hsp70-Familie für einen effizienten Proteinimport in Peroxisomen konnte durch *in vitro* Importversuche gezeigt werden (Walton *et al.*, 1994). Proteine der Hsp40-Familie, sogenannte DnaJ-homologe Proteine bzw. DnaJ-Proteine sind Wechselwirkungspartner von Hsp70 und determinieren über ihre Interaktion mit Substratproteinen auch die Substratspezifität des Hsp70-Partnerproteins (Rassow *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß das cytosolische DnaJ-homologe Protein Djp1p der Bäckerhefe absolut notwendig ist für einen effizienten Import peroxisomaler Matrixproteine (Hettema *et al.*, 1998). Diese Befunden belegen, das auch beim Proteinimport in Peroxisomen Molekulare Chaperone eine wichtige, wenn auch noch nicht verstandene, Funktion übernehmen.

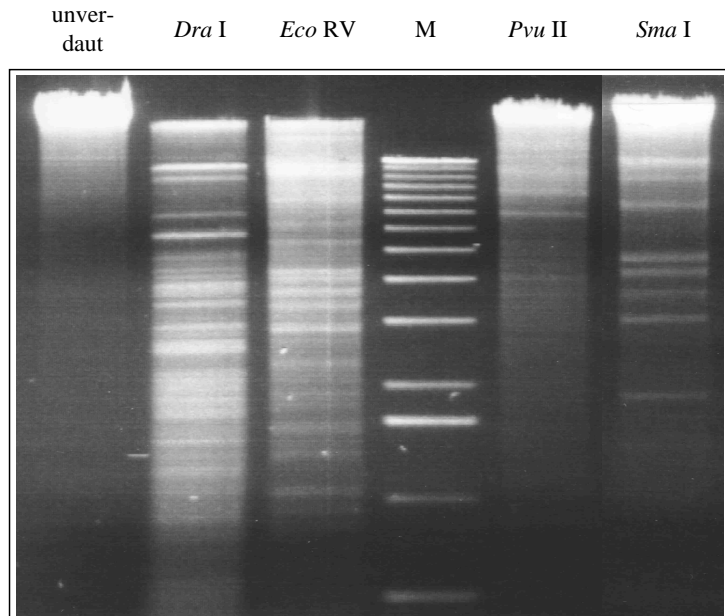
Im Rahmen der Dissertation sollten Hsp70-Partnerproteine des an der cytosolischen Seite der Glyoxysomen verankerten DnaJ-Proteins aus Gurke identifiziert werden (Preisig-Müller *et al.*, 1994). Aus Vorarbeiten war bekannt, daß mit Hilfe einer löslichen Form des DnaJp mit His-Tag bei Anwesenheit von ADP cytosolische Isoformen von Hsp70 aus dem 100000 x g Überstand einer Zellfraktionierung in einem Komplex immobilisiert werden können (Diefenbach, 1997). Es sollte die Frage geklärt werden, welche der verschiedenen Isoformen von Hsp70 Wechselwirkungspartner des DnaJp aus Gurke darstellen. Hierzu mußten cDNA-Sequenzen, die für die vollständige Aminosäuresequenz verschiedener cytosolischer Hsp70-Isoformen codieren, isoliert werden. Desweiteren wurde untersucht, welche Formen der Hsp70-Familie sich in der Matrix von Glyoxysomen befinden.

#### 3.1 Isolierung und Klonierung von genomischer DNA und cDNA von zwei cytosolischen Isoformen von Hsp70

Aus früheren Untersuchungen von R. Preisig-Müller standen cDNA-Sequenzen von zwei verschiedenen cytosolischen Isoformen von Hsp70 zur Verfügung, deren Nukleotidsequenzen jedoch nicht für die vollständige Aminosäuresequenz der beiden Hsp70 codieren (Klon csHsp70-1: 1872 bp; Klon csHsp70-2: 1074 bp). Aufgrund der hochkonservierten Genstruktur vieler bekannter pflanzlicher Hsp70-Gene (DeRocher und Vierling, 1995), schien es erfolgversprechend zur Ermittlung der unbekannten N-terminalen Proteinsequenz der beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen von genomischer DNA auszugehen. Hierdurch ließen sich auch Unabwägbarkeiten in der Herstellung von cDNA-Bibliotheken umgehen (3.1.4).

### 3.1.1 Präparation von genomischer DNA und Verdau mit Restriktionsenzymen

Zur Präparation von DNA aus Gurke wurde das DNeasy™ Plant Mini Kit (Fa. Qiagen) verwendet (2.3.2).



**Abb. 3.1: Analyse der genomischen DNA nach Verdau mit Restriktionsenzymen zur Klonierung von Hsp70-Genen**

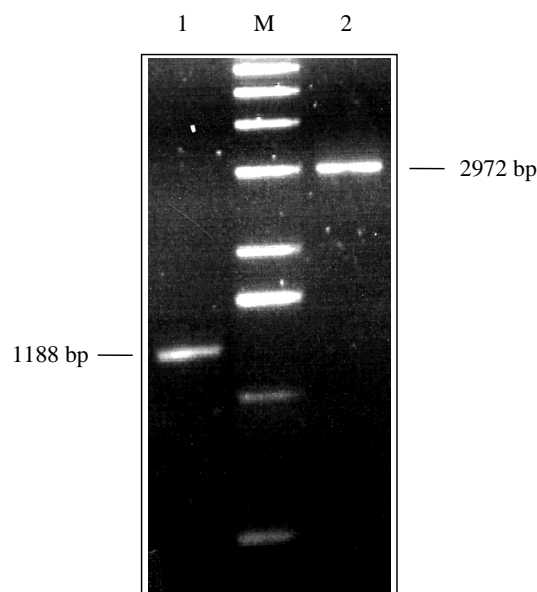
Jeweils 2.5 µg genomische DNA aus Gurke wurden mit 80 U der verschiedenen Restriktionsenzyme für 17 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Extraktion mit Phenol/Chloroform durchgeführt und die DNA mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde in 20 µl Tris-Puffer resuspendiert und 10 µl der Lösung auf dem Agarosegel analysiert. Die andere Hälfte der Probe wurde nach einer Adaptorligation für die Genome-Walker-PCR verwendet. Von der unverdauten genomischen DNA wurden 1.25 µg aufgetragen. **M:** Molmarker X von Roche Molecular Biochemicals.

Die Probe der unverdauten genomischen DNA zeigt, daß die Nukleinsäuren während der Präparation durch Scherkräfte nicht übermäßig fragmentiert wurden. Die DNA enthielt nur geringe Mengen an Verunreinigungen ( $A_{260/280} = 1.7$ ) und Enzym-Inhibitoren, da durch Verdau mit Restriktionsenzymen, insbesondere mit *Dra I* und *Eco RV*, größere Mengen von DNA-Fragmenten mit einer Größenverteilung zwischen 1-5 kb erhalten werden konnten.

### 3.1.2 Genome-Walker-PCR mit genspezifischen Primern für zwei verschiedene cytosolische Isoformen von Hsp70

Es existieren verschiedene PCR-basierte Methoden, um in unklonierter genomischer DNA von einer Region mit bekannter Sequenz in eine Region mit unbekannter Sequenz vorzudringen.

Von besonderer Bedeutung ist die Methode der Adaptorligation an genomische DNA, da durch besondere Eigenschaften des Adaptors die Spezifität der PCR-Amplifikation erheblich gesteigert werden kann (Siebert *et al.*, 1995). Ein Adaptor mit diesen besonderen Eigenschaften wurde durch Inkubation äquimolarer Mengen zweier synthetischer Oligonukleotide hergestellt (2.3.3). Durch Verwendung von Restriktionsenzymen, die beim Verdau glatte DNA-Enden erzeugen, konnte nach Aufarbeitung des Verdaus sofort die Ligation des Adaptors an die DNA-Fragmente erfolgen (2.3.3). Der Ligationsansatz wurde direkt als Template einer PCR mit einem genspezifischen- und einem Adaptorprimer eingesetzt. In einer zweiten, sogenannten „nested PCR“, mit einem Aliquot des ersten PCR-Ansatzes als Template, wurden ein zweiter genspezifischer- und ein zweiter Adaptorprimer verwendet.



**Abb. 3.2: Analyse der Fragmente, die bei der Genome-Walker-PCR erhaltenen wurden**

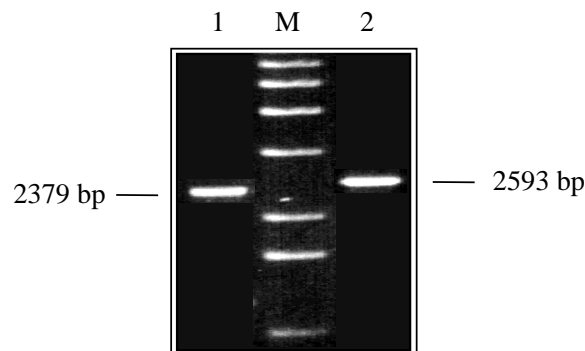
Nach dem Verdau der genomischen DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen erfolgte die Ligation des Genome-Walker-Adaptors (2.3.3). In einer PCR wurde mit Hilfe von zwei genspezifischen Primern und zwei Adaptor-Primern versucht, Fragmente unbekannter Sequenz von beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 zu erhalten. Ausgehend von der mit *Dra* I verdauten genomischen DNA konnten mit genspezifischen Primern für beide Isoformen cytosolischer Hsp70 Fragmente amplifiziert werden. In einer nested PCR mit einem zweiten genspezifischen Primer und dem zweiten Adaptor-Primer AP2 konnte mit den Hsp70-1-spezifischen Primern ein 1188 bp Fragment amplifiziert werden (**Bahn 1**), welches neben einem 423 bp großen Intron und 214 bp vom N-Terminus auch 545 bp des Promotorbereiches von Hsp70-1 enthielt. Bei Verwendung von genspezifischen Primern für Hsp70-2 konnte in einer zweiten, nested PCR ein 2972 bp Fragment amplifiziert werden (**Bahn 2**), welches neben einem 652 bp großen Intron und 216 bp vom N-Terminus auch 476 bp des Promotorbereiches von Hsp70-2 enthielt. **M:** Molmarker X von Roche Molecular Biochemicals.

Von den unterschiedlich langen cDNA-Sequenzen der beiden cytosolischen Hsp70 (Hsp70-1: 1872 bp  $\approx$  95 % der Gesamtsequenz; Hsp70-2: 1074 bp  $\approx$  55 % der Gesamtsequenz) wurden jeweils aus dem 5'-Bereich zwei genspezifische Primer abgeleitet (für Hsp70-1: 1-rev III und 1-rev IV-*Bam* HI; für Hsp70-2: 2-antisense und 2-uni I-*Mlu* I). Ausgehend von der mit *Dra* I verdauten genomischen DNA konnten für beide cytosolischen Isoformen in der Genome-

Walker-PCR Fragmente amplifiziert werden, die glücklicherweise so groß waren, daß in beiden Fällen neben den unbekannten Sequenzen, die für den vollständigen N-Terminus beider Proteine codieren, auch noch 476 bp bzw. 545 bp des Promotors enthalten waren. Das 1188 bp-Fragment (Hsp70-1) wurde durch Verdau mit *Not* I und *Bam* HI in den entsprechend linearisierten Vektor pcDNA3 (Fa. Invitrogen) kloniert und sequenziert. Das 2972 bp-Fragment (Hsp70-2) wurde durch Verdau mit *Not* I und *Mlu* I in den entsprechend linearisierten Vektor pCI (Fa. Promega) kloniert und sequenziert. Aus den Sequenzen konnten genspezifische Primer vom extremen N-Terminus für beide Isoformen abgeleitet werden (für Hsp70-1: 1-ATG-*Xho* I; für Hsp70-2: 2-ATG-*Xho* I).

### 3.1.3 Struktur der Gene von zwei cytosolischen Isoformen von Hsp70

Um Aussagen über die Struktur beider Gene machen zu können, wurde eine PCR ausgehend von unverdauter genomischer DNA mit Primern gegen den extremen N- und C-Terminus beider cytosolischer Hsp70 durchgeführt.



**Abb. 3.4: Analyse der genomischen Hsp70-Fragmente**

Ausgehend von unverdauter genomischer DNA wurde eine PCR mit Primern gegen den extremen N- und C-Terminus beider cytosolischer Hsp70 durchgeführt. In der **Bahn 1** wurden 10 % des Reaktionsansatzes einer PCR mit den Hsp70-1-spezifischen Primern (1-ATG-*Xho* I und 1-EEVD-*Mlu* I) und in der **Bahn 2** 10 % des Reaktionsansatzes einer PCR mit den Hsp70-2-spezifischen Primern (2-ATG-*Xho* I und 2-EEVD-*Mlu* I) aufgetragen. **M:** Molmarker X von Roche Molecular Biochemicals.

Bei Verwendung von spezifischen Primern für cytHsp70-1 konnte ein Fragment von ca. 2.4 kb erhalten werden. Bei einer Größe der cDNA-Sequenz von Hsp70-1 von 1956 bp und einer Introngröße von 423 bp ergibt sich eine Größe von 2379 bp, was sehr gut mit der Größe des amplifizierten Fragmentes übereinstimmt. Somit besitzt das Hsp70-1-Gen nur ein Intron von 423 bp. Für das Hsp70-2-Gen ergibt sich dieselbe Struktur mit ebenfalls nur einem Intron von 652 bp.

Die Nukleotidsequenzen beider Gene sind in den beiden folgenden Abbildungen dargestellt.

AAATTTATACAGATAGTCGAAGAAGAAAAACCCCTCCAATACAAATACATGATCTAAATCACATAGCATAAACAATTTGTACATTTTCTTTTAAAGACTACGACAATTCAATGACTTTGA	119
ATAGTCACAACTCATTACTATGAAATTGAGAGATTAAAAAATAATATCCATAGTAGAAAATTTAATAAAAAAGAGAAGGGCAAAAAGGTAATAAAAGATGATATATAAATAAAGA	238
AAGGGAAAAAGAAAGTTCTAGAAAACCTAGAGAGTAGAAAAAGTAACGGTCGACGTTATATTTTGTATGTTTCATACGCCAAACGCAAAATAACTTTTCAGCCTTAACATATCTTTTCCCA	357
TTAGAACTCTCTAGAACCTTATTTTCTCTCTTAAAGTTTCTATATAAACCTTCCGCCCTCTCTTCTTCTCCTTATAACTTCAAACTCTTAAACCTTAAATCTGCACCCACCAA	476
TCAGTTTCTCTTGCTTTCCTTTCTTATCATCGTAGATTCTTTTTTCAATCGACGATTGAACGTTCACT	581
M A G K G E G P A I G I	12
GAT CTT GGA ACT ACA TAC TCT TGC GTC GGT GTG TGG CAG CAT GAT CGA GTT GAG ATC TTT GCC AAC GAC CAG GGT AAC AGG ACC ACG CCG	671
D L G T T Y S C V G V W Q H D R V E I F A N D Q G N R T T P	42
TCG TAT GTT GCT TTC ACC GAC TCT GAG CGC TTG ATC GGT GAT GCA GCT AAG AAT CAG GTC GCC ATG AAC CCG ATT AAT ACC GTT TTT G	759
S Y V A F T D S E R L I G D A A K N Q V A M N P I N T V F	71
GTAAGCCTTTTTTCTGTGTTTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGTTTGAGTGTCTGTCTTATGGAGTTTTTCTGTGTTCTTGAGAAATGGATTGAGTTGTTTCGAGTTTATAGAAAGT	878
ATGTGCCTAATCGGAGCGCTTATAGTTGTTGCTACTTTGATGAGTTGAACCTGAGGGTATATTTACGATTTCCTTTTGGAGTTTGTGCTGAGGTTTTTGTATAGTTCTTGATTATATC	997
GCTTTTGGTTTTCTCGAGTTTGGTCTTAGTCCATGCGAGTGATGTTTTTAAAGCTAGTTCAACTGTTTATTATTTCTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCTGAGTTAAGCGGG	1116
TTTTTCGTTATTTGTTTGGTGTGTTGATGCTGTTTGATTGATCAGCTCTTTTGTGTTTATTATCAG	1219
AT GCC AAG CGT TTA ATT GGC CGA AGA TTT AGC GAT GCA	84
D A K R L I G R R F S D A	
TCG GTC CAG AGT GAT ATC AAG CTC TGG CCG TTT AAA GTT ATT GCT GGT CCT AGC GAT AAG CCA ATG ATC GTT GTA AAC TAC AAG GGT GAG	1309
S V Q S D I K L W P F K V I A G P S D K P M I V V N Y K G E	114
GAG AAG CAG TTC TCT GCT GAA GAA ATC TCT TCT ATG GTG CTC ATA AAG ATG AAG GAA ATT GCT GAG GCG TAT CTC GGC ACA ACA GTG AAG	1399
E K Q F S A E E I S S M V L I K M K E I A E A Y L G T T V K	144
AAT GCC GTC GTC ACT GTC CCG GCT TAC TTC AAC GAT TCT CAG AGA CAG GCC ACC AAG GAT GCT GGT GTC ATT TCC GGC CTA AAT GTG ATG	1489
N A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G V I S G L N V M	174
CGT ATT ATC AAT GAA CCA ACA GCT GCC GCC ATT GCT TAT GGT CTT GAC AAG AAG TCA AGC AGC TCT GGC GAA AAG AAC GTT CTA ATT TTC	1579
R I I N E P T A A A I A Y G L D K K S S S S G E K N V L I F	204
GAT TTG GGT GGT GGT ACA TTT GAT GTT TCA TTG CTT ACA ATC GAA GAA GGT ATT TTT GAG GTG AAG TCA ACT GCC GGA GAC ACT CAT CTG	1669
D L G G G T F D V S L L T I E E G I F E V K S T A G D T H L	234
GGT GGT GAA GAT TTT GAC AAC AGA TTG GTT AAC CAT TTC GTG CAA GAA TTC AAG AGA AAA AAC AAG AAA GAC ATT AGT GGA AAC CCC AGA	1759
G G E D F D N R L V N H F V Q E F K R K N K K D I S G M P R	264
GCT CTA AGA AGA TTG AGA ACC GCT TGT GAA AGG GCG AAG AGG ACA CTT TCC TCC ACA GCT CAA ACT ACA ATT GAG ATT GAT TCT CTT TAC	1849
A L R R L R T A C E R A K R T L S S T A Q T T I E I D S L Y	294
GAA GGA ATT GAC TTC TAT TCA ACC ATT ACT CGT GCT AGA TTT GAA GAA CTC AAT ATG GAT CTT TTC AGG AAG TGT ATG GAA CCA GTT GAG	1939
E G I D F Y S T I T R A R F E E L N M D L F R K C M E P V E	324
AAG TGT TTG AGA GAT GCC AAG ATG GAT AAA AGC ACT GTA CAT GAT GTT GTT CTT GTT GGT GGT TCT ACT AGG ATT CCT AAA GTG CAG CAA	2029
K C L R D A K M D K S T V H D V V L V G G S T R I P K V Q Q	354
TTG TTG CAA GAT TTC TTC GAT GGC AAA GAG CTT TGC AAG AGT ATC AAC CCT GAT GAA GCT GTT GCC TAT GGA GCT GCT GTT CAA GCT GCC	2119
L L Q D F F D G K E L C K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A	384
ATT TTG AGT GGT GAG GGT AAT GAG AAG GTT CAA GAT CTT CTG CTC TTG GAT GTT ACC CCT CTT TCC CTT GGT CTC GAA ACA GCC GGT GGT	2209
I L S G E G M E K V Q D L L L L D V T P L S L G L E T A G G	414
GTG ATG ACT GTC TTG ATT CCA AGG AAT ACC ACC ATC CCC ACC AAG AAA GAA CAA GTT TTC TCT ACA TAT TCC GAC AAT CAG CCT GGT GTT	2299
V M T V L I P R N T T I P T K K E Q V F S T Y S D N Q P G V	444
TTG ATC CAA GTC TAT GAA GGT GAG AGA GCA AGA ACC GCG GAC AAC AAC TTG CTT GGA AAA TTC GAG CTC TCT GGA ATC CCT CCG GCT CCA	2389
L I Q V Y E G E R A R T R D N N L L G K F E L S G I P P A P	474
AGA GGT GTT CCT CAG ATT ACA GTT TGC TTC GAC ATC GAC GCC AAT GGT ATT CTC AAC GTC TCT GCC GAG GAT AAA ACC ACT GGT CAG AAG	2479
R G V P Q I T V C F D I D A N G I L N V S A E D K T T G Q K	504
AAC AAG ATC ACA ATC ACG AAT GAC AAG GGG CGG TTG TCG AAG GAA GAG ATT GAG AAG ATG GTG CAA GAA GCA GAG AAA TAC AAG GCG GAT	2569
N K I T I T N D K G R L S K E E I E K M V Q E A E K Y K A D	534
GAT GAG GAG CAC AAG AAG AAG GTT GAA GCG AAG AAC TCC TTG GAA AAC TAT GCT TAT AAC ATG AGG AAC ACT GTG AGG GAT GAG AAG TTC	2659
D E E H K K K V E A K N S L E N Y A Y N M R N T V R D E K F	564
AGC TCC AAA TTG GAT CCG GCA GAC AAA AAG AAG ATT GAG GAT GCC ATT GAA CAG GCA GTC CAG TGG CTT GAC AAC AAC CAA CTT GCT GAA	2749
S S K L D P A D K K K I E D A I E Q A V Q W L D N N Q L A E	594
GCT GAT GAG TTC GAA GAT AAA ATG AAG GAG CTT GAG AGT ATT TGC AAC CCC ATC GTT GCT AAG ATG TAT CAA GGT GCT GGA GGA CCT GGC	2839
A D E F E D K M K E L E S I C N P I V A K M Y Q G A G G P G	624
ATG GGC GGC GGT GCT ATG GAT GAC GAT GAT GCT CCT CCT CCA TCC GGC GGC AGT GGC GCG GGT CCT AAG ATT GAA GAA GTT GAT TAA	2926
M G G G A M D D D D A P P P S G G S G A G P K I E E V D *	652
ATTTAGTTTCTTTTGATTGTGATGGGAGGATTGAGGCGATGAAAATTTTCTTTATACAATGGAATGATGATTTTGGGTTTCTTTTGTCTTTAAATTTTGTGTTTTTGGGCCA	3045
CCCCCTAGTTAATGAAGGAAAGTTTATCTTATTGTAAATTCATCGCCAATCCGTTTAAAGAAGACGCTTTTGAATCGT	3126

### Abb. 3.5-1: Nukleotidsequenz des Gens der cytosolischen Isoform 1 von Hsp70 (cyt. Hsp70-1)

Die Lage des Heat Shock Elements (HSE) ist durch eine Kasten markiert. Die TATA-Box ist unterstrichen.

Die Lage des Heat Shock Elements (HSE) ist durch eine Kasten markiert. Die TATA-Box ist unterstrichen.



Beide Gene enthalten ein Intron von 423 bp (cytHsp70-1) bzw. 652 bp (cytHsp70-2). In beiden Fällen befindet sich das Intron an einer hochkonservierten Stelle bei der Asparaginsäure Nummer 72. Für die meisten pflanzlichen Hsp70-Gene, die für cytosolische Isoformen codieren, ist ein Intron unterschiedlicher Größe an dieser Stelle der Aminosäuresequenz gefunden worden (Rochester *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1988). Die Intron-Exon-Übergänge enthalten die hochkonservierten Dinukleotide. Bei beiden Hsp70-Genen beginnt das Intron mit der Consensus-Sequenz 5'-GT-3' am 5'-Anfang des Introns und endet mit dem konservierten Dinukleotid 5'-AG-3' am 3'-Ende des Introns.

Die vorhergesagten Stellen der Translations-Initiation stimmen mit der Regel von Kozak (Kozak, 1984) überein.

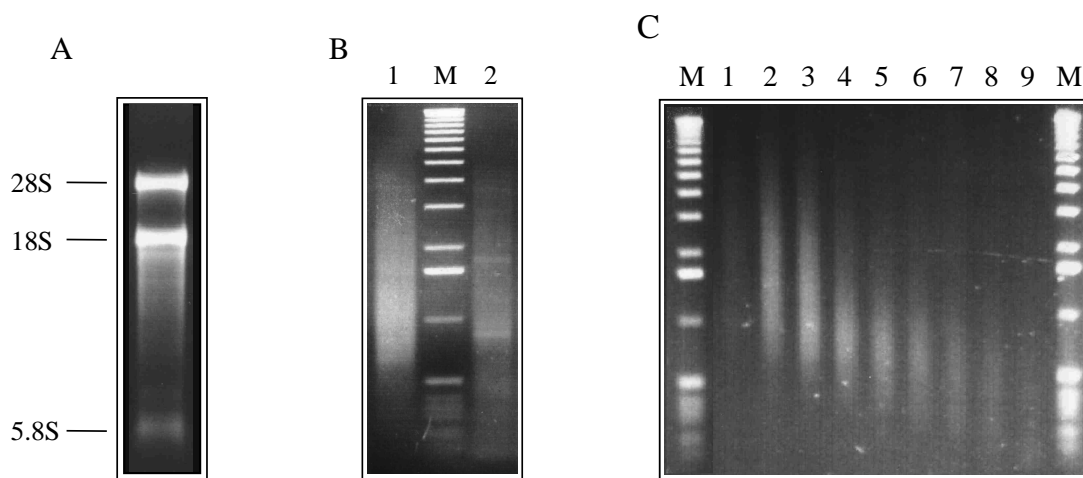
Neben der TATA-Box befinden sich im Promotorbereich der beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 Sequenzmotive für die Bindung eines *Heat Shock Factors* (HSF). Ein solches *Heat Shock Element* (HSE) ist als eine Abfolge benachbarter, invertierter Pentamere mit der Sequenz 5'-NGAAN-3' beschrieben worden (Cunniff und Morgan, 1993). Die Abfolge dreier Pentamere stellt eine Bindungsstelle für ein HSF-Homotrimer dar (Fernandes *et al.*, 1994).

### 3.1.4 Herstellung einer cDNA-Bibliothek und Screening nach cytosolischen Hsp70

Zur Isolierung von cDNA-Sequenzen, die für die vollständige Aminosäuresequenz der beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 codieren, wurde eine neue cDNA-Bibliothek erstellt.

Ein großes Problem bei der konventionellen cDNA-Synthese nach Gubler und Hoffman (1983) besteht darin, daß die Reverse Transkriptase in der Regel nicht die vollständige mRNA transkribiert, sondern aus verschiedenen Gründen bereits vor dem eigentlichen 5'-Ende die Transkription abbricht. Hierdurch ist die Anzahl der Klone innerhalb einer cDNA-Bibliothek unterrepräsentiert, die eine cDNA enthalten, welche auch für den extremen N-Terminus des entsprechenden Proteins codiert. Dies kann im Extremfall dazu führen, das selbst bei sehr guter Qualität der für die reverse Transkription verwendeten poly(A)<sup>+</sup>-RNA in einer ansonsten repräsentativen cDNA-Bibliothek kein Klon enthalten ist, dessen cDNA für die vollständige Aminosäuresequenz des gesuchten Proteins codiert. Das geschilderte Problem ist offensichtlich bei den cDNA-Bibliotheken, aus denen die beiden Teilsequenzen cytosolischer Hsp70 isoliert worden waren, aufgetreten, da zwar viele verschiedene Klone mit cDNA-Inserts für die beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen gefunden wurden, jedoch kein einziger „volle-Länge-Klon“. Da aber nur ein Interesse an der Isolierung von „volle-Länge-cDNA-Sequenzen“ der beiden Hsp70s bestand, erschien es wenig erfolgversprechend, erneut eine cDNA-Bibliothek mit einer konventionell nach Gubler und Hoffman synthetisierten cDNA zu erstellen. Deshalb wurde eine neue Methode der cDNA-Synthese gewählt, die zu cDNA-Bibliotheken führt, bei denen der Anteil von „volle-Länge-cDNA-Klonen“ signifikant höher liegt, als bei konventionellen cDNA-Bibliotheken.

Bei der SMART™ cDNA-Synthese-Methode (Fa. Clontech) wird ein Primer verwendet, der bevorzugt an der 7-Methylguanosin-Capstruktur am extremen 5'-Ende der mRNA anlagert und mit transkribiert wird. Hierdurch entsteht eine Einzelstrang-cDNA, die am 3'-Ende eine Sequenz enthält, die komplementär zu dem verwendeten SMART™-Oligonukleotid ist. In einer anschließenden PCR mit dem bereits bei der reversen Transkription verwendeten Primer gegen die Poly-A-Sequenz am 3'-Ende der mRNA und einem Primer gegen die SMART-Sequenz am 3'-Ende der cDNA werden nur solche cDNA-Moleküle amplifiziert, die am 3'-Ende die SMART™-Sequenz tragen. Da es sich hierbei in der Mehrzahl der Fälle, um cDNA-Konstrukte vollständiger Länge handelt, enthält eine auf diese Art erzeugte cDNA-Bibliothek nachweisbar eine höhere Anzahl von „volle-Länge-cDNA-Klonen“.



**Abb. 3.6: Analyse von verschiedenen Stadien der cDNA-Synthese**

Gesamt-RNA wurde aus zwei Tage alten Gurkenkotyledonen isoliert (2.2.1) und 4 µg in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel analysiert (A). Für die Erststrangsynthese von cDNA wurden 1.58 µg Poly (A)<sup>+</sup>-RNA mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen an Primern und anderen Komponenten mit 200 U MMLV RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase eine Stunde bei 42°C inkubiert (2.7.1). Die erhaltene Einzelstrang-cDNA wurde mit Hilfe von PCR in 21 Zyklen nach Anweisung des Herstellers amplifiziert und 5 % des Reaktionsansatzes auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert (B, Bahn 1). Als Positivkontrolle wurde mit der vom Hersteller mitgelieferten Gesamt-RNA aus humanen Skelettmuskel ebenfalls eine cDNA-Synthese mit anschließender PCR-Amplifikation durchgeführt und 5 % des Reaktionsansatzes auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert (B, Bahn 2). Nach der Ligation von *Eco* RI-Adaptoren an die amplifizierte cDNA und anschließender Phosphorylierung der Adaptor-ligierten cDNA (2.2.2) wurde eine Größenfraktionierung nach Anweisung des Herstellers durchgeführt (2.7.3). Von den cDNA enthaltenden Fraktionen wurden jeweils 3 µl auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert (C). M: Molmarker X von Roche Molecular Biochemicals.

Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurde die in der Fraktion 2 enthaltene cDNA verwendet, die bereits phosphorylierte *Eco* RI-Adaptoren trug. Die Ligation erfolgte unge richtet in den mit *Eco* RI linearisierten und dephosphorylierten Vektor pT7T3-18U (Fa. Pharmacia). Die Transformation der ligierten cDNA erfolgte in kompetente Zellen des Stammes *E. coli* XL-2 Blue (Fa. Stratagene). Es wurden ca. 90000 positive Transformanten ausplattiert.

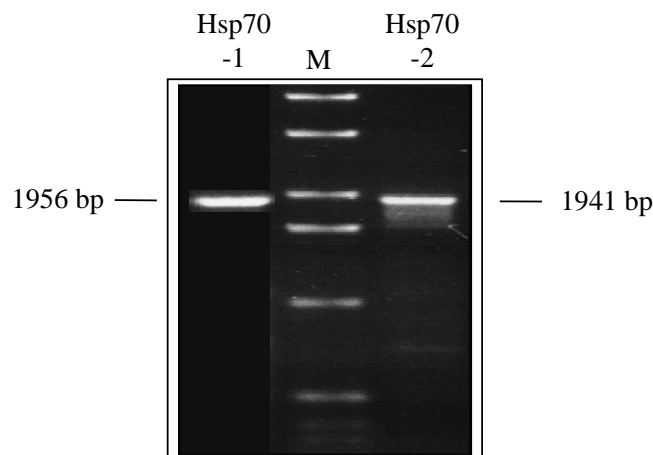
Zum Screening der cDNA-Bibliothek wurde ein 392 bp-Fragment vom extremen C-Terminus der cytosolischen Hsp70-Isoform 2 verwendet, welches mit Hilfe von PCR mit den Primern 2-Forward-*Bam* HI und 2-Reverse-*Pst* I hergestellt wurde. Das gelgereinigte Fragment wurde durch „random priming“ mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP radioaktiv markiert. Aus diesem Screening resultierten insgesamt elf Klone, deren Inserts vollständig sequenziert wurden. Hierdurch wurden acht Klone identifiziert, die cDNA-Inserts enthielten, welche für die cytosolische Hsp70-Isoform 2 codierten. Die Inserts wiesen eine Größe zwischen 400 bp und 1200 bp auf. Die restlichen drei Klone enthielten cDNA-Inserts, die für die cytosolische Hsp70-Isoform 1 codierten. Auch in diesem Fall hatten die Inserts nur eine Größe zwischen 500 bp und 700 bp.

Nach diesem unbefriedigenden Ergebnis stellte sich die Frage nach möglichen Ursachen für die beim Screening erhaltenen, kleinen Insertgrößen. Ausgehend von der größenfraktionierten, unligierten cDNA wurde eine PCR mit Primern gegen den extremen C-Terminus bzw. N-Terminus einer cytosolischen Lipoxxygenase-Isoform durchgeführt, wobei ein Amplifikat in der erwarteten Größe von 2.8 kb erhalten werden konnte (Ahnert *et al.*, 1996). Somit war die verwendete mRNA von ausreichender Qualität gewesen und auch die Methode der cDNA-Synthese mit anschließender PCR-Amplifikation schien nicht die Ursache für die außergewöhnlich kleinen Insertgrößen in der cDNA-Bibliothek zu sein. Offensichtlich sind bei der Ligation in das Plasmid pT7T3-18U bevorzugt nur kleinere cDNA-Fragmente ligiert worden oder bei der nachfolgenden Transformation sind überwiegend Plasmide mit kleinerem cDNA-Insert in die Bakterienzellen aufgenommen worden. Jedenfalls konnten neben dem 2.8 kb-Fragment einer Lipoxxygenase-Isoform auch die vollständigen cDNA-Sequenzen der beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen aus dem Pool der größenfraktionierten, unligierten cDNA amplifiziert werden (2.5.2), nachdem mit Hilfe von „Genome Walking PCR“ die unbekannten Sequenzen ermittelt worden waren. Dies macht deutlich, daß im Pool der für die Ligation eingesetzten größenfraktionierten cDNA-Fragmente der gewünschten Größe enthalten waren. Möglicherweise wäre bei der vom Hersteller empfohlenen Ligation der cDNA in den Phagen  $\lambda$ gt11 das Problem der kleinen Insertgrößen nicht aufgetreten.

Um die unbekannten N-terminalen Sequenzen beider cytosolischer Hsp70 zu ermitteln, sollte die Methode der „Genome Walking PCR“ verwendet werden (Siebert *et al.*, 1995), da aufgrund der hochkonservierten Struktur pflanzlicher Hsp70-Gene (Bates *et al.*, 1994) nicht mit Introngrößen gerechnet werden mußte, die einen Erfolg dieser Methode in Frage gestellt hätten.

### 3.1.5 PCR-Amplifikation und Klonierung von cDNA-Sequenzen, die für die beiden cytosolischen Hsp70 codieren

Anhand der Sequenz-Information, die aus den PCR-Fragmenten von genomischer DNA erhalten wurde, konnten Primer gegen den extremen N-Terminus beider Hsp70 Isoformen abgeleitet werden (1-ATG-*Xho* I und 2-ATG-*Xho* I). Ausgehend von der PCR-amplifizierten, unklonierten cDNA (Abb. 3.6B) konnte für beide cytosolischen Isoformen von Hsp70 ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden (2.5.2).



**Abb. 3.7: Analyse der bei der RT-PCR erhaltenen Fragmente von den cytosolischen Hsp70-Isoformen 1 und 2**

Ausgehend von der amplifizierten cDNA wurde mit spezifischen Primern gegen den extremen N- und C-Terminus beider cytosolischer Hsp70-Isoformen eine PCR durchgeführt (2.5.2). Die Amplifikate konnten sowohl mit der Taq- als auch mit der Vent<sub>R</sub>-DNA-Polymerase erhalten werden. Da die zur Amplifikation verwendeten Primer Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Xho* I und *Mlu* I enthielten konnten beide Fragmente gerichtet in den entsprechend linearisierten pCI-Vektor kloniert werden (2.5.5). **M:** Molmarker X von Roche Molecular Biochemicals.

Beide PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Mlu* I verdaut und gerichtet in den entsprechend linearisierten Vektor pCI (Fa. Promega) kloniert. Ein Vergleich der beiden vollständigen cDNA-Sequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ist in der Abb. 3.8 dargestellt. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden cytosolischen Hsp70-Formen nur im C-terminalen Bereich, wo die Isoform-1 einen Einschub eines Prolins bzw. der Aminosäuren – MDDD- aufweist.

HSP70-1	ATG	GCC	GGT	AAA	GGA	GAA	GGT	CCG	GCT	ATC	GGA	ATC	GAT	CTT	GGA	ACT	ACA	TAC	TCT	TGC	GTG	GGT	GTG	TGG	72	
HSP70-2	...	...	..C	..G	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	..C	..T	..C	..T	...	...	..T	..G	...	..T	...		
Hsp70-1	M	A	G	K	G	E	G	P	A	I	G	I	D	L	G	T	T	Y	S	C	V	G	V	W	24	
Hsp70-2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CAG	CAT	GAT	CGA	GTT	GAG	ATC	TTT	GCC	AAC	GAC	CAG	GGT	AAC	AGG	ACC	ACG	CCG	TCG	TAT	GTT	GCT	TTC	ACC	GAC	TCT	150
..A	..C	...	..T	...	...	...	A..	...	..T	...	...	...	...	...	..T	..T	..T	..C	...	...	..C	...	...	..T	A..	
Q	H	D	R	V	E	I	F	A	N	D	Q	G	N	R	T	T	P	S	Y	V	A	F	T	D	S	50
*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T
GAG	CGC	TTG	ATC	GGT	GAT	GCA	GCT	AAG	AAT	CAG	GTC	GCC	ATG	AAC	CCG	ATT	AAT	ACC	GTT	TTT	GAT	GCC	AAG	CGT	TTA	228
...	..T	...	..T	...	...	..T	...	...	..C	...	...	A..	...	...	...	...	..C	...	..C	...	..C	..A	...	A.G	..G	
E	R	L	I	G	D	A	A	K	N	Q	V	A	M	N	P	I	N	T	V	F	D	A	K	R	L	76
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ATT	GGC	CGA	AGA	TTT	AGC	GAT	GCA	TCG	GTC	CAG	AGT	GAT	ATC	AAG	CTC	TGG	CCG	TTT	AAA	GTT	ATT	GCT	GGT	CCT	AGC	306
..C	..T	A..	...	..C	...	..C	T.T	..A	...	..A	...	..C	...	...	T.G	...	..A	..C	..G	..C	..C	C..	..A	..A	G.T	
I	G	R	R	F	S	D	A	S	V	Q	S	D	I	K	L	W	P	F	K	V	I	A	G	P	S	102
*	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	p	*	*	G	
GAT	AAG	CTA	ATG	ATC	GTT	GTA	AAC	TAC	AAG	GGT	GAG	GAG	AAG	CAG	TTC	TCT	GCT	GAA	GAA	ATC	TCT	TCT	ATG	GTG	CTC	384
..C	...	..C	...	...	A..	..C	.G.	...	...	...	..GA	...	...	...	...	G..	...	...	...	...	...	..C	...	..T	..T	
D	K	P	M	I	V	V	N	Y	K	G	E	E	K	Q	F	S	A	E	E	I	S	S	M	V	L	128
*	*	*	*	*	I	*	S	*	*	*	G	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ATA	AAG	ATG	AAG	GAA	ATT	GCT	GAG	GCG	TAT	CTC	GGC	ACA	ACA	GTG	AAG	AAT	GCC	GTC	GTC	ACT	GTC	CCG	GCT	TAC	TTC	462
..T	...	...	CGT	...	...	..C	..A	..T	..C	...	..T	T.C	..T	...	..C	...	..T	...	..T	...	..T	..T	...	...	...	
I	K	M	K	E	I	A	E	A	Y	L	G	T	T	V	K	N	A	V	V	T	V	P	A	Y	F	154
*	*	*	R	*	*	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAC	GAT	TCT	CAG	AGA	CAG	GCC	ACC	AAG	GAT	GCT	GGT	GTC	ATT	TCC	GGC	CTA	AAT	GTG	ATG	CGT	ATT	ATC	AAT	GAA	CCA	540
...	..C	..C	..A	C.T	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G.T	..T	..C	..C	..C	...	A.G	...	...	...	..C	
N	D	S	Q	R	Q	A	T	K	D	A	G	V	I	S	G	L	N	V	M	R	I	I	N	E	P	180
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ACA	GCT	GCC	GCC	ATT	GCT	TAT	GGT	CTT	GAC	AAG	AAG	TCA	AGC	AGC	TCT	GGC	GAA	AAG	AAC	GTT	CTA	ATT	TTC	GAT	TTG	618
..C	...	..T	...	...	..C	..C	...	...	...	...	..A	G..	..CA	..T	GTC	..T	...	...	..T	..C	TCG	..C	...	...	C.T	
T	A	A	A	I	A	Y	G	L	D	K	K	S	S	S	S	G	E	K	N	V	L	I	F	D	L	206
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	T	*	V	*	*	*	*	*	S	*	*	*	*	*
GGT	GGT	GGT	ACA	TTT	GAT	GTT	TCA	TTG	CTT	ACA	ATC	GAA	GAA	GGT	ATT	TTT	GAG	GTG	AAG	TCA	ACT	GCC	GGA	GAC	ACT	696
...	...	...	..T	...	...	..C	..T	C.T	..C	..C	..T	...	..G	...	..C	..C	...	...	...	G.C	...	..T	...	...	...	
G	G	G	T	F	D	V	S	L	L	T	I	E	E	G	I	F	E	V	K	S	T	A	G	D	T	232
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*
CAT	CTG	GGT	GGT	GAA	GAT	TTT	GAC	AAC	AGA	TTG	GTT	AAC	CAT	TTC	GTG	CAA	GAA	TTC	AAG	AGA	AAA	AAC	AAG	AAA	GAC	774
...	..T	...	..G	...	...	...	...	...	...	C.T	..C	...	..C	..T	..T	...	A..	..T	...	..G	..G	C..	...	..G	..T	
H	L	G	G	E	D	F	D	N	R	L	V	N	H	F	V	Q	E	F	K	R	K	N	K	K	D	258
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	K	*	*	*	*	H	*	*	*	*
ATT	AGT	GGA	AAC	CCC	AGA	GCT	CTA	AGA	AGA	TTG	AGA	ACC	GCT	TGT	GAA	AGG	GCG	AAG	AGG	ACA	CTT	TCC	TCC	ACA	GCT	852
..C	...	..C	...	...	...	...	..T	...	..G	C..	...	..T	T..	...	..G	..A	..T	...	..A	..T	..C	..A	..T	..T	...	
I	S	G	N	P	R	A	L	R	R	L	R	T	A	C	E	R	A	K	R	T	L	S	S	T	A	284
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CAA	ACT	ACA	ATT	GAG	ATT	GAT	TCT	CTT	TAC	GAA	GGA	ATT	GAC	TTC	TAT	TCA	ACC	ATT	ACT	CGT	GCT	AGA	TTT	GAA	GAA	930
..G	..C	..C	...	...	..C	...	...	T.G	...	...	...	...	...	..T	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	
Q	T	T	I	E	I	D	S	L	Y	E	G	I	D	F	Y	S	T	I	T	R	A	R	F	E	E	310
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CTC	AAT	ATG	GAT	CTT	TTC	AGG	AAG	TGT	ATG	GAA	CCA	GTT	GAG	AAG	TGT	TTG	AGA	GAT	GCC	AAG	ATG	GAT	AAA	AGC	ACT	1008
T.G	..C	...	...	...	...	..A	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..G	...	...	...	
L	N	M	D	L	F	R	K	C	M	E	P	V	E	K	C	L	R	D	A	K	M	D	K	S	T	336
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GTA	CAT	GAT	GTT	GTT	CTT	GTT	GGT	GGT	TCT	ACT	AGG	ATT	CCT	AAA	GTG	CAG	CAA	TTG	TTG	CAA	GAT	TTC	TTC	GAT	GGC	1086
..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	..C	..G	..C	..A	..G	...	...	...	..C	...	...	A..	...	...	
V	H	D	V	V	L	V	G	S	T	R	I	P	K	V	Q	Q	L	L	Q	D	F	F	D	G		362
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

AAA GAG CTT TGC AAG AGT ATC AAC CCT GAT GAA GCT GTT GCC TAT GGA GCT GCT GTT CAA GCT GCC ATT TTG AGT GGT	1164
..G ..A ..C ... ..C ..T ... ..C ... ..C ... ..C ..T ... ..A ... ..C ... ..C ...	
K E L C K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G	388
* *	
GAG GGT AAT GAG AAG GTT CAA GAT CTT CTG CTC TTG GAT GTT ACC CCT CTT TCC CTT GGT CTC GAA ACA GCC GGT GGT	1242
..A ..C ... ..C ... ..G ..G ... ..T ..A ... ..C ... ..C ... ..T ... ..T.G ... ..C ... ..A	
E G N E K V Q D L L L L D V T P L S L G L E T A G G	414
* *	
GTG ATG ACT GTC TTG ATT CCA AGG AAT ACC ACC ATC CCC ACC AAG AAA GAA CAA GTT TTC TCT ACA TAT TCC GAC AAT	1320
..C ... ..C ..T C.T ..C ... ..A ..C ... ..A ..T ... ..G ... ..G ... ..C ... ..C ... ..C	
V M T V L I P R N T T I P T K K E Q V F S T Y S D N	440
* *	
CAG CCT GGT GTT TTG ATC CAA GTC TAT GAA GGT GAG AGA GCA AGA ACC CGC GAC AAC AAC TTG CTT GGA AAA TTC GAG	1398
... ..C ... ..G ... ..A ..C ... ..A ..G A.. ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..A	
Q P G V L I Q V Y E G E R A R T R D N N L L G K F E	466
* *	
CTC TCT GGA ATC CCT CCG GCT CCA AGA GGT GTT CCT CAG ATT ACA GTT TGC TTC GAC ATC GAC GCC AAT GGT ATT CTC	1476
... ..C ... ..A ... ..C ..G ... ..A ..A ..C ... ..G ... ..T ..T ... ..T ... ..C ... ..C T.G	
L S G I P P A P R G V P Q I T V C F D I D A N G I L	492
* *	
AAC GTC TCT GCC GAG GAT AAA ACC ACT GGT CAG AAG AAC AAG ATC ACA ATC ACG AAT GAC AAG GGG CGG TTG TCG AAG	1554
... ..C ... ..A ..C ..G ... ..A ... ..A ... ..A ... ..C ..T ..T ..C ... ..A A.A C.C ..C ...	
N V S A E D K T T G Q K N K I T I T N D K G R L S K	518
* *	
GAA GAG ATT GAG AAG ATG GTG CAA GAA GCA GAG AAA TAC AAG GCG GAT GAT GAG GAG CAC AAG AAG AAG GTT GAA GCG	1632
..G ... ..C ... ..G ... ..G ... ..T.T ..A ... ..C ... ..A ... ..C ... ..C	
E E I E K M V Q E A E K Y K A D D E E H K K K V E A	544
* *	
AAG AAC TCC TTG GAA AAC TAT GCT TAT AAC ATG AGG AAC ACT GTG AGG GAT GAG AAG TTC AGC TCC AAA TTG GAT CCG	1710
... ..T G.T ... ..G ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C	
K N S L E N Y A Y N M R N T V R D E K F S S K L D P	570
* * A *	
GCA GAC AAA AAG AAG ATT GAG GAT GCC ATT GAA CAG GCA GTC CAG TGG CTT GAC AAC AAC CAA CTT GCT GAA GCT GAT	1788
..C ... ..G ... ..C ..C ... ..C ..G ... T.C A.. ..A ... ..G ... GC. ... ..G ..A ... ..G ... ..C	
A D K K K I E D A I E Q A V Q W L D N N Q L A E A D	596
* * * * * * * D * * * * * * S I * * * * * A * * * * * *	
GAG TTC GAA GAT AAA ATG AAG GAG CTT GAG AGT ATT TGC AAC CCC ATC GTT GCT AAG ATG TAT CAA GGT GCT GGA GGA	1866
... ..C ..G ... ..C ... ..C ... ..C ... ..A ... A.. ..C ... ..C ... ..C ... ..C	
E F E D K M K E L E S I C N P I V A K M Y Q G A G G	622
* *	
CCT GGC ATG GGC GGC GGT GCT ATG GAT GAC GAT GAT GCT CCT CCT CCA TCC GGC GGC AGT GGC GCG GGT CCT AAG ATT	1944
--- .AT ... ..T ... ..A --- --- --- --- ..C .AC AG. G.. ..T ... ..C ..T ..T ..A ..C ... ..C	1929
P G M G G A M D D D D A P P P S G G S G A G P K I	648
- D * * * * * - - - - * D S A * * * * * * * * * * *	643
GAA GAA GTT GAT TAA	1959
..G ... ..C ..G ...	1944
E E V D *	652
* * * * *	647

Abb. 3.8: cDNA-Sequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenzen der beiden cytosolischen Hsp70

. markiert eine identische Base, \* markiert eine identische Aminosäure, - markiert eine Aminosäuredeletion.

Q G A G G P G M G G G A M D D D D A P P P S G G S G A G P K I E E V D  
 \* \* \* \* A - D \* \* \* \* \* - - - \* D S A \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

**Abb. 3.8a: Vergleich der C-Termini zwischen der cytosolischen Hsp70-Isoform-1 und der Isoform-2**

Dargestellt sind die Aminosäuren 618 bis 652 der Isoform-1, die verglichen wurden mit der Isoform-2.

\* markiert eine identische Aminosäure, - markiert eine Aminosäuredeletion.

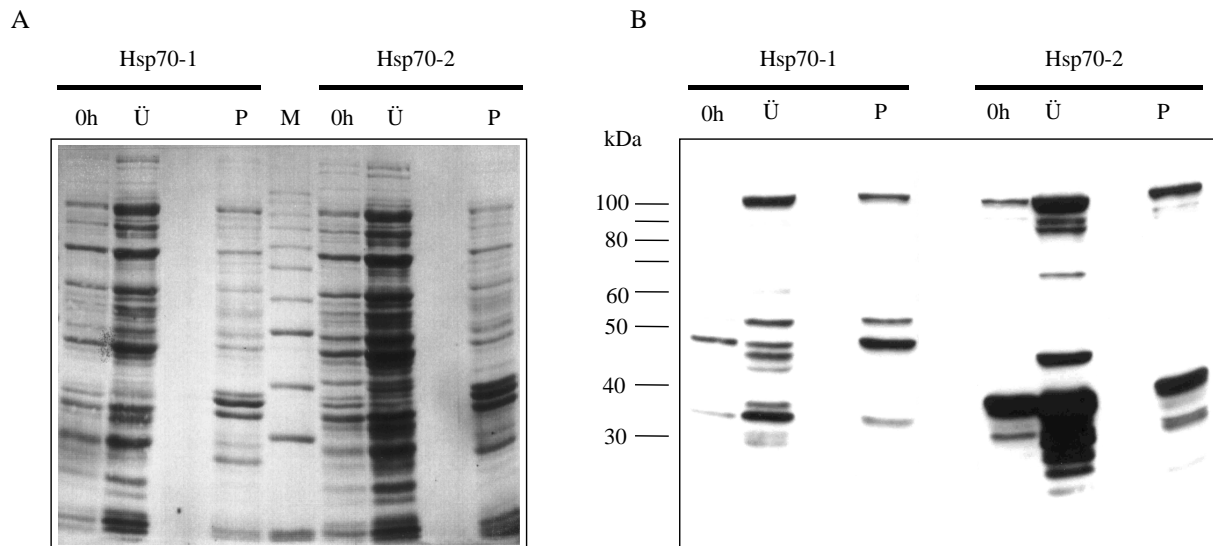
Auffälligster Unterschied zwischen den Aminosäuresequenzen der beiden cytosolischen Isoformen sind zwei Aminosäuredeletionen bei der Isoform 2 im extremen C-Terminus. An zwei Stellen sind bei der Isoform 2 insgesamt fünf Aminosäuren deletiert, so daß sich ein Größenunterschied von 652 Aminosäuren der Isoform 1 zu 647 Aminosäuren der Isoform 2 ergibt. Diese Deletionen könnten für die großen Unterschiede in der Affinität zu DnaJ-Proteinen verantwortlich sein (vgl. 3.3).

### 3.2 Herstellung von Fusionsproteinen von beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen

Ein häufiges Problem bei der Expression von Fusionsproteinen mit His-Tag ist, daß die Proteine meist in unlöslicher Form in sogenannten *inclusion bodies* vorliegen. Eine Renaturierung ist zwar häufig möglich, jedoch besteht die Unsicherheit, ob das renaturierte Protein tatsächlich in einer enzymatisch aktiven, nativen Konformation vorliegt. Bei der Verwendung anderer Affinitäts-Tags tritt dieses Problem weniger häufig auf. Daher sollten von beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* hergestellt werden. Hierzu wurden beide cDNAs aus dem Vektor pCI durch Verdau mit *Xho* I und *Not* I isoliert und über dieselben Schnittstellen im korrekten Leseraster in den Vektor pGEX-5x-1 kloniert. Hierdurch entsteht bei der bakteriellen Expression ein Fusionsprotein zwischen dem C-Terminus der Glutathion S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* und dem N-Terminus des Hsp70.

#### 3.2.1 Bakterielle Expression und Reinigung der beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine

Der Vektor pGEX-5x-1 mit der vollständigen cDNA von cytHsp70-1 bzw. cytHsp70-2 wurde in kompetente Zellen des Stammes *E. coli* M15[pREP4] transformiert. Positive Transformanten wurden isoliert und zur Kontrolle des Leseraster sequenziert. Klone mit korrekter Sequenz wurden zu bakterieller Expression eingesetzt. Das Löslichkeitsverhalten der beiden Fusionsproteine bei der Expression wurde durch Vergleich der Anteile an Fusionsprotein im löslichen Überstand (Ü) und im Pellet (P) untersucht.

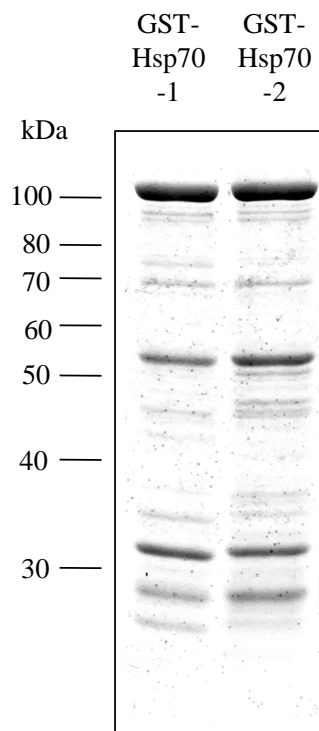


**Abb. 3.9: Analyse der bakteriellen Expression der beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine**

Von einer 100 ml Kultur wurden vor der Induktion der Fremdproteinexpression bei einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von ca. 1.1 500  $\mu$ l Bakterienkultur abzentrifugiert, das Pellet in 50  $\mu$ l SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5  $\mu$ l zur Elektrophorese eingesetzt (**0h**). Nach Induktion mit 0.2 mM IPTG für 75 Minuten bei 23°C wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert, in 3.6 ml Ultraschallpuffer resuspendiert und aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden pelletiert, in 1.5 ml Ultraschallpuffer resuspendiert und 5  $\mu$ l zur Elektrophorese eingesetzt (**P**). Vom Überstand der Zentrifugation wurden 3  $\mu$ l aufgetragen (**Ü**). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und mit Tinte angefärbt (**A**). Die Immunanfärbung erfolgte mit Antiserum gegen cytosolische Hsp70 (**B**). **M**: 10 kDa Leiter von Lifetechnologies.

In der Immunanfärbung des Western-Blots mit Antiserum gegen cytosolische Hsp70 erkennt man, daß unter den gewählten Expressionsbedingungen der überwiegende Anteil beider Fusionsproteine im löslichen Überstand vorliegt. Somit konnten die Überstände für eine Reinigung beider Proteine an GSH-Agarose verwendet werden. Die deutliche Bildung von Fragmenten, welche vom Antiserum erkannt werden, kann verschiedene Ursachen haben. Neben proteolytischem Abbau tritt bei der bakteriellen Expression heterologer eukaryontischer Proteine häufig der Fall auf, daß in den heterologen Sequenzen Codons auftreten, die von *E. coli* selten verwendet werden. Dadurch kann es dann bei der Translation zum verfrühten Abbruch und zur Freisetzung von Teilfragmenten der Proteine kommen. Da das Antiserum gegen cytosolische Hsp70 jedoch nur Epitope vom extremen C-Terminus (116 AS) cytosolischer Hsp70 erkennt, muß es sich bei den in der Abb. 3.10B detektierten Teilfragmenten um proteolytischen Abbau handeln. Die Aufarbeitung der Bakterienzellen erfolgte deshalb bei allen weiteren Experimenten in Anwesenheit einer Kombination von verschiedenen Proteaseinhibitoren. Zur Reinigung der beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine wurden Bakterienzellen für 5 h bei 23°C mit 0.2 mM IPTG induziert und die klarzentrifugierten Überstände nach dem Aufschluß der Zellen mit GSH-Agarose in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren für 16 h bei 4°C inkubiert. Nach intensiver Waschung wurden die immobilisierten Proteine mit Elutionspuffer mit 50 mM reduziertem Glutathion eluiert. Die eluierten Proteine wurden in Bindungspuffer umpuffer und die Reinheit auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert.





**Abb. 3.10: Reinigung der beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine über GSH-Agarose**

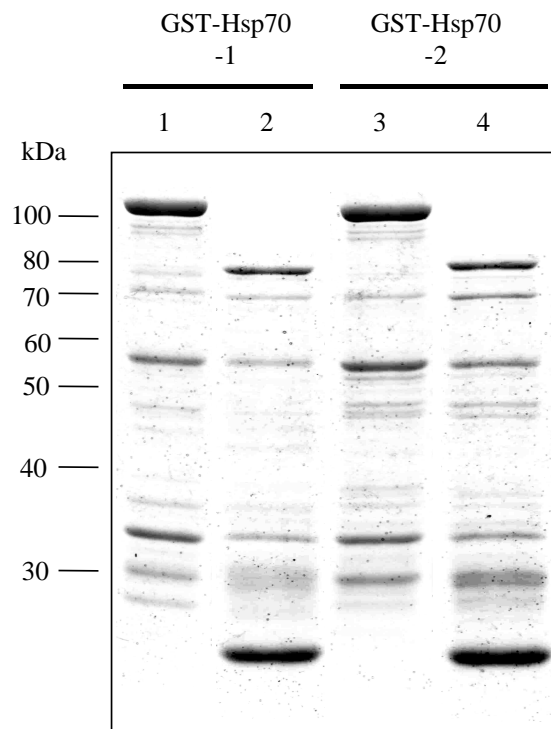
Nach Induktion einer Bakterienkultur mit 0.2 mM IPTG für 5 Stunden bei 23°C wurden die Zellen abzentrifugiert, aufgeschlossen und der klarzentrifugierte Überstand bei 4°C für 16 Stunden unter leichtem Schütteln mit GSH-Agarose inkubiert. Anschließend wurde das Affinitätsmaterial gründlich gewaschen und die immobilisierten GST-Fusionsproteine mit Elutionspuffer mit 50 mM reduziertem Glutathion eluiert (2.9.3.1). Nach der Elektrophorese in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt. Die Proteinbanden bei ca. 53 kDa bzw. 32 kDa in den Eluat von beiden Fusionsproteinen konnten mit einem anti-GST-Antikörper angefärbt werden. Es handelt sich offensichtlich um Teilfragmente der Hsp70-GST-Fusionsproteine, die über den GST-Tag an das Affinitätsmaterial binden und mit aufgereinigt wurden.

Die gereinigten GST-Hsp70-Fusionsproteine enthielten noch größere Mengen von Fragmenten, die mit einem Antiserum gegen den GST-Tag angefärbt werden konnten. Insbesondere die Proteinbanden bei ca. 53 kDa bzw. ca. 32 kDa konnten mit dem GST-Antiserum angefärbt werden. Bei diesen Proteinbanden handelt es sich offensichtlich um Teilfragmente der Hsp70-GST-Fusionsproteine, die über den GST-Tag an die GSH-Agarose binden und mit gereinigt wurden. Beide Präparationen waren jedoch geeignet, um in den Wechselwirkungsversuchen mit bakteriell exprimierten, gereinigten DnaJ-Proteinen eingesetzt werden zu können (3.3.3 und 3.3.4).

### 3.2.2 Spaltung der Hsp70-GST-Fusionsproteine mit der Protease Faktor Xa

Der für die bakterielle Expression der beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine verwendete Vektor pGEX-5x-1 besitzt zwischen dem codierenden Abschnitt für die Glutathion S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* und den Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der gewünschten

cDNA noch eine DNA-Sequenz, die für fünf Aminosäuren codiert und eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa darstellt. Die beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine sollten somit eine Schnittstelle für diese Protease tragen. Da in der Aminosäuresequenz beider cytosolischer Hsp70 keine Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa gefunden werden konnte, sollte es bei einer Inkubation der gereinigten Fusionsproteine mit Faktor Xa zur Abspaltung des GST-Tags und zur Freisetzung des Hsp70s kommen.



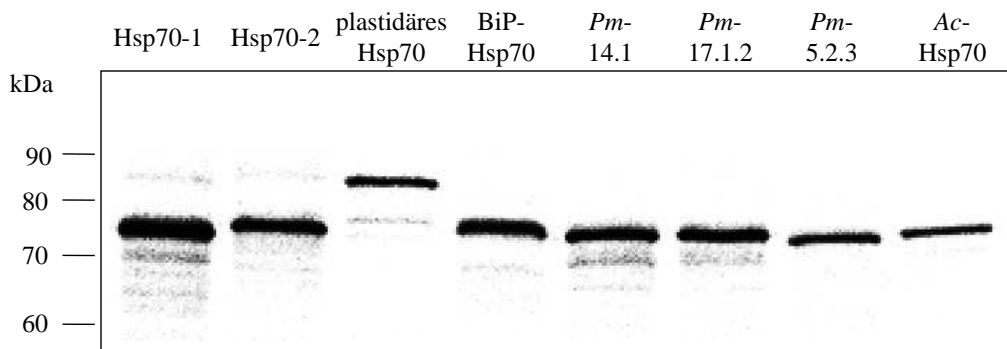
**Abb. 3.11: Spaltung der beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine mit der Protease Faktor Xa**

Die aufgereinigten Hsp70-GST-Fusionsproteine wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  umgepuffert und pro  $\mu\text{g}$  Fusionsprotein mit 0.1  $\mu\text{g}$  Protease Faktor Xa für 23 Stunden bei 25°C inkubiert. Zur Entfernung des Biotin-markierten Faktors Xa wurde der Reaktionsansatz mit Streptavidin-Gel für 30 Minuten bei 25°C unter leichtem Schütteln inkubiert und das Gel anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. In **Bahn 1 und 3** wurden die unverdauten Fusionsproteine und in **Bahn 2 und 4** die mit Protease behandelten Fusionsproteine aufgetragen. Nach der SDS-Page wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt.

Bei einer Inkubation der gereinigten Hsp70-GST-Fusionsproteine mit der Protease Faktor Xa für 23 h bei 25°C konnte der GST-Tag vollständig abgespalten werden. Die Freisetzung des GST-Fragmentes von ca. 26 kDa ist in der Coomassie-Anfärbung deutlich zu erkennen. Zur Abtrennung des Biotin-markierten Faktors Xa wurde der Reaktionsansatz mit Streptavidin-Gel für 30 Minuten bei 25°C unter leichtem Schütteln inkubiert und das Gel anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Die gespaltenen Hsp70s wurden zur Untersuchung der ATPase-Aktivität verwendet (3.5).

### 3.2.3 Herstellung von radioaktiv markierten Hsp70

Zur Ermittlung der Wechselwirkungspartner des DnaJ-Proteins sollten verschiedene Isoformen von Hsp70 aus Gurke und auch verschiedene cytosolische Isoformen aus anderen Organismen verwendet werden. Hierzu wurde von Plasmiden, deren cDNA-Insert unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors steht, in einer gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation mit [<sup>35</sup>S]-L-Methionin radioaktiv markierte Proteine hergestellt.

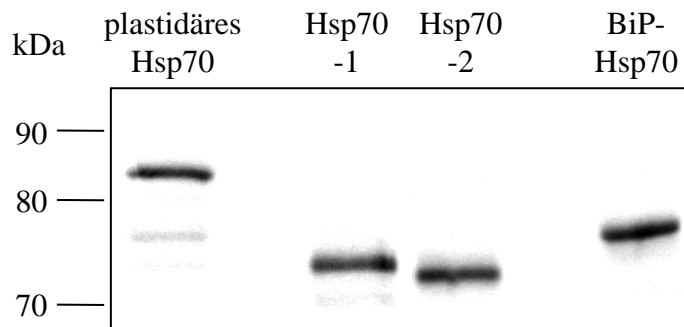


**Abb. 3.12: Präparation von radioaktiv markierten Hsp70 durch *in vitro*-Transkription/Translation**

Von Plasmiden, deren cDNA-Insert unter Kontrolle des Promotors der RNA-Polymerase T7 steht, wurden durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markierte Proteine erhalten. Zur Analyse wurden jeweils 1 µl des Translationsansatzes auf einem 9 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das Gel nach der Elektrophorese getrocknet. Um die Mengen an radioaktiv markiertem Protein quantifizieren zu können, wurden das getrocknete Gel mit einer Imagerplatte exponiert, die an einem Bioimager (Fa. Fuji) ausgelesen wurde. In den ersten vier Bahnen sind verschiedene Hsp70-Isoformen aus Gurke aufgetragen. In den anderen vier Bahnen sind verschiedene cytosolische Hsp70-Isoformen aus dem Oomyceten *Phytophthora megasperma* (Pm) bzw. aus der Ölhefe *Apiotrichum curvatum* (Ac) aufgetragen.

Die verschiedenen Hsp70-Isoformen wurden unterschiedlich gut translatiert, was in den unterschiedlichen Radioaktivitätsmengen zum Ausdruck kommt, die bei einer Quantifizierung der Signalintensitäten am Bioimager verglichen werden konnten. Um in den Bindungsexperimenten mit löslichem His-DnaJp (3.3.2) bzw. mit Glyoxysomen (3.3.5) jeweils gleiche Mengen an radioaktiv markiertem Hsp70 einzusetzen, wurde von allen Hsp70-Proben vor dem Bindungsversuch ein SDS-Polyacrylamidgel gefahren und die Menge an radioaktiv markiertem Hsp70 am Bioimager quantifiziert.

Zur Charakterisierung der vier verschiedenen Hsp70-Isoformen aus Gurke wurden die radioaktiv markierten Proteine auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert.



**Abb. 3.13: Größenvergleich der vier verschiedenen Hsp70-Isoformen aus Gurke**

Von Plasmiden, deren cDNA-Insert unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors steht, wurden durch gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation in Anwesenheit von [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markierte Proteine erhalten. Zur Analyse wurden jeweils 1  $\mu$ l des Translationsansatzes auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, das Gel nach der Elektrophorese getrocknet und eine Fluorographie angefertigt. Die cDNA des plastidären Hsp70 enthielt die vollständige Signalsequenz für die Chloroplasten, alle anderen Hsp70-Isoformen enthielten die gesamte kodierende cDNA-Sequenz. Hsp70-1 und Hsp70-2 sind cytosolische Isoformen, BiP-Hsp70 besitzt ein ER-Retentionssignal (-KDEL).

Das plastidäre Hsp70 mit der vollständigen Signalsequenz läuft in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel bei einer molekularen Masse von ca. 84 kDa. Die cytosolische Isoform 1 läuft bei geringfügig größerer molekularer Masse von ca. 74 kDa als die cytosolische Isoform 2 (ca. 73 kDa). Das BiP-verwandte Hsp70 läuft bei ca. 77 kDa.

### 3.3 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und DnaJ-Proteinen

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß es bei Anwesenheit von 2 mM ADP zur Ausbildung eines stabilen Komplexes zwischen löslichem His-DnaJp und cytosolischen Isoformen von Hsp70 kommt (Diefenbach, 1997). Nachdem zwei verschiedene cytosolische Isoformen von Hsp70 aus Gurke sowohl als Hsp70-GST-Fusionsproteine, als auch in Form radioaktiv markierter Proteine zur Verfügung standen, konnten eine Reihe von Wechselwirkungsexperimente durchgeführt werden, mit denen Unterschiede in der Affinität von DnaJ-Proteinen zu verschiedenen cytosolischen Isoformen von Hsp70 getestet werden sollten.

In einem ersten Experiment wurde das bakteriell exprimierte, gereinigte His-DnaJp in verschiedenen Ansätzen entweder mit dem radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-1 oder mit dem radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-2 inkubiert. Möglicherweise gebildete Komplexe sollten dann über den His-Tag des His-DnaJp an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose immobilisiert werden. Das Affinitätsmaterial mit den Komplexen wurden intensiv gewaschen und die gebundenen Proteine mit 250 mM Imidazol von der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose eluiert. Von den elu-

ierten Proteinen wurde eine SDS-Page durchgeführt und von dem getrockneten Gel eine Autoradiographie angefertigt (3.3.2).

In einem analogen Versuchsansatz wurden anstatt der radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-Isoformen die beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine verwendet. Die nach den Waschschritten noch am Affinitätsmaterial immobilisierten Proteine wurden mit 250 mM Imidazol eluiert, eine SDS-Page durchgeführt, anschließend die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und die verschiedenen Reaktionsansätze in einer Immunanfärbung gegen cytosolische Hsp70 auf die Anwesenheit der beiden Hsp70-Isoformen untersucht (3.3.3).

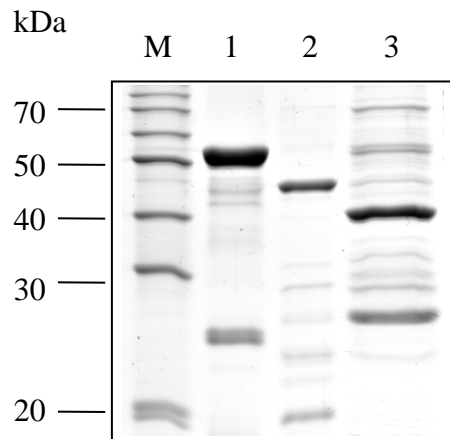
Desweiteren sollte untersucht werden, ob andere DnaJ-Protein ebenfalls eine Wechselwirkung mit cytosolischen Isoformen von Hsp70 eingehen können. Hierzu wurden in einem analogen Versuchsansatz anstatt des DnaJp aus Gurke Sis-Proteine aus zwei pilzlichen Organismen verwendet (3.3.4).

Abschließend sollte ein Wechselwirkungsexperiment mit intakten Glyoxysomen als Quelle des DnaJp durchgeführt werden. Hierbei wurde das 12000 x g Pellet einer Zellfraktionierung als Glyoxysomen-Quelle verwendet. Das resuspendierte 12000 x g Pellet wurde mit verschiedenen, radioaktiv markierten Hsp70-Isoformen inkubiert, die Glyoxysomen durch eine Gleichgewichtsdichtezentrifugation isoliert und die Bedingungen charakterisiert, unter denen eine radioaktiv markierte Hsp70-Isoform mit Glyoxysomen cosedimentiert werden kann (3.3.5).

### 3.3.1 Bakterielle Expression und Reinigung von DnaJ-Proteinen

Neben der löslichen Form des auf der cytosolischen Seite von Glyoxysomen verankerten DnaJ-Proteins aus Gurke sollten noch weitere DnaJ-Proteine in ihren Bindungseigenschaften gegenüber cytosolischen Isoformen von Hsp70 untersucht werden. Hierzu standen DnaJ-Proteine aus zwei verschiedenen pilzlichen Organismen zur Verfügung. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Sis-Homologe, die ebenfalls die charakteristische J-Domäne aller DnaJ-Proteine enthalten (Specht *et al.*, 1998).

Nach Expression der drei verschiedenen DnaJ-Proteine wurden die löslichen Überstände der aufgeschlossenen Bakterienzellen klarzentrifugiert. Die mit einem His-Tag versehenen Fusionsproteine wurden an TALON<sup>TM</sup> Spin Säulen (Fa. Clontech) gereinigt und in Bindungspuffer überführt. Die Reinheit der umgepufferten Fusionsproteine wurde gelelektrophoretisch analysiert.



**Abb. 3.14:** Analyse der bakteriell exprimierten DnaJ-Proteine, die durch Affinitätschromatographie gereinigt wurden.

Klarzentrifugierte bakterielle Extrakte von induzierten Zellen wurden über TALON™ Spin Säulen aufgereinigt (2.9.3.2). Nach Elution mit 250 mM Imidazol wurden die Proteine in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. In **Bahn 1** wurde His-DnaJp aus *Cucumis sativus*, in **Bahn 2** His-Sis1p aus *Phytophthora megasperma* und in **Bahn 3** His-Sis1p aus *Apiotrichum curvatum* aufgetragen.

**M:** 10 kDa Leiter von Lifetechnologies.

Alle drei DnaJ-Proteine konnten in ausreichender Reinheit und Menge in löslicher Form präpariert werden, um in den Wechselwirkungsversuchen mit verschiedenen Hsp70-Isoformen eingesetzt werden zu können.

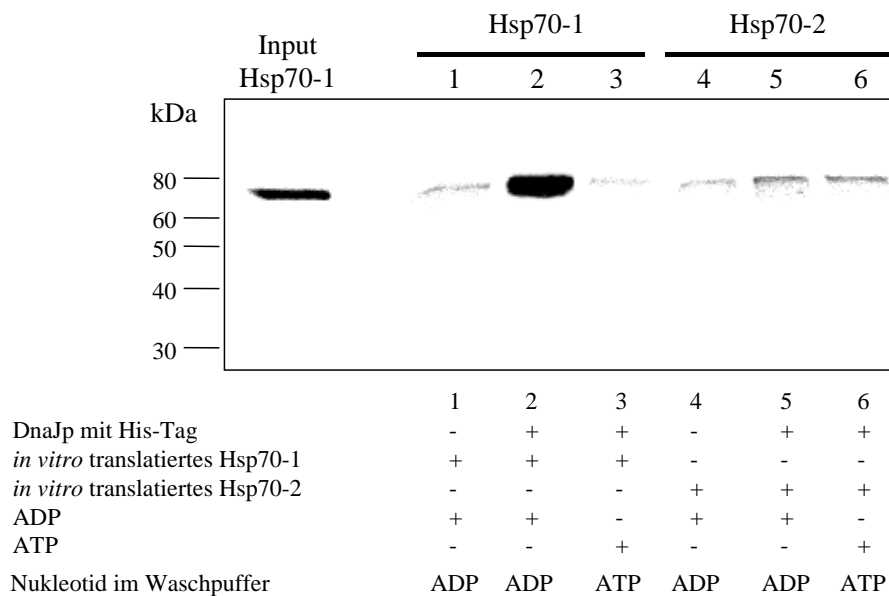
### 3.3.2 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Hsp70-1-Translatat und His-DnaJp

In einem ersten Experiment sollten die beiden radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-Isoformen in ihrer Affinität gegenüber His-DnaJp getestet werden.

Bei der Verwendung von *in vitro* translatierten Proteinen für die Bindungsexperimente stellte sich das Problem, daß im Translationsansatz ein ATP-Regenerationssystem aus Creatinphosphat und Creatinkinase enthalten ist. Dieses System kann dazu führen, daß bei der Durchführung des Bindungsexperimentes das zugesetzte ADP, welches zur Ausbildung eines stabilen Komplexes absolut notwendig ist, in ATP überführt wird. Hierdurch kann es zum Zerfall des Komplexes kommen. Somit mußte bei den für die Wechselwirkungsexperimente verwendeten radioaktiv markierten Proteinen das im Retikulozytenlysat enthaltene ATP-Regenerationssystem inaktiviert werden. Hierzu wurden die für die Bindungsexperimente eingesetzten radioaktiv markierten Proteine vorher 1 h bei 100000 x g in der Airfuge abzentrifugiert, um möglicherweise gebildete Aggregate bzw. noch an Polysomen assoziierte radioaktiv markierte Proteine abzutrennen. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde über eine Nick Spin Säule (Pharmacia) in Bindungspuffer überführt (2.8.1). Hierdurch wurde gleichzeitig das

ATP-Regenerationssystem inaktiviert, da beim Umpuffern über die Nick Spin Säule das Creatinphosphat als Phosphatlieferant für die Creatinkinase entfernt wird.

In dem Wechselwirkungsexperiment wurde das bakteriell exprimierte, gereinigte His-DnaJp in verschiedenen Ansätzen mit den beiden radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-Isoformen inkubiert. Möglicherweise gebildete Komplexe sollten über den His-Tag des His-DnaJp an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose immobilisiert werden. Das Affinitätsmaterial wurden intensiv gewaschen und die gebundenen Proteine mit 250 mM Imidazol von der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose eluiert. Von den eluierten Proteinen wurde eine SDS-Page durchgeführt und vom getrockneten Gel eine Autoradiographie angefertigt:



**Abb. 3.15: Nachweis der Wechselwirkung zwischen Hsp70-1-Translatat und His-DnaJp durch Bindung des binären Komplexes an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätsmaterial**

Die beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen wurden durch gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation als [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin-markierte Proteine hergestellt und nach einstündiger Zentrifugation bei 100000 x g in Bindungspuffer überführt. Gleiche Mengen an radioaktiv markiertem Hsp70 wurden mit 10  $\mu\text{M}$  gereinigtem His-DnaJp in Anwesenheit von 2 mM ADP für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (10000 x g, 4°C) wurden die Überstände zu 20  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose pipettiert und 20 Minuten bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Affinitätsmaterial mit 6 ml Waschpuffer mit 2 mM ADP gewaschen, die gebundenen Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert und nach SDS-PAGE das getrocknete Gel mit Röntgenfilm exponiert.

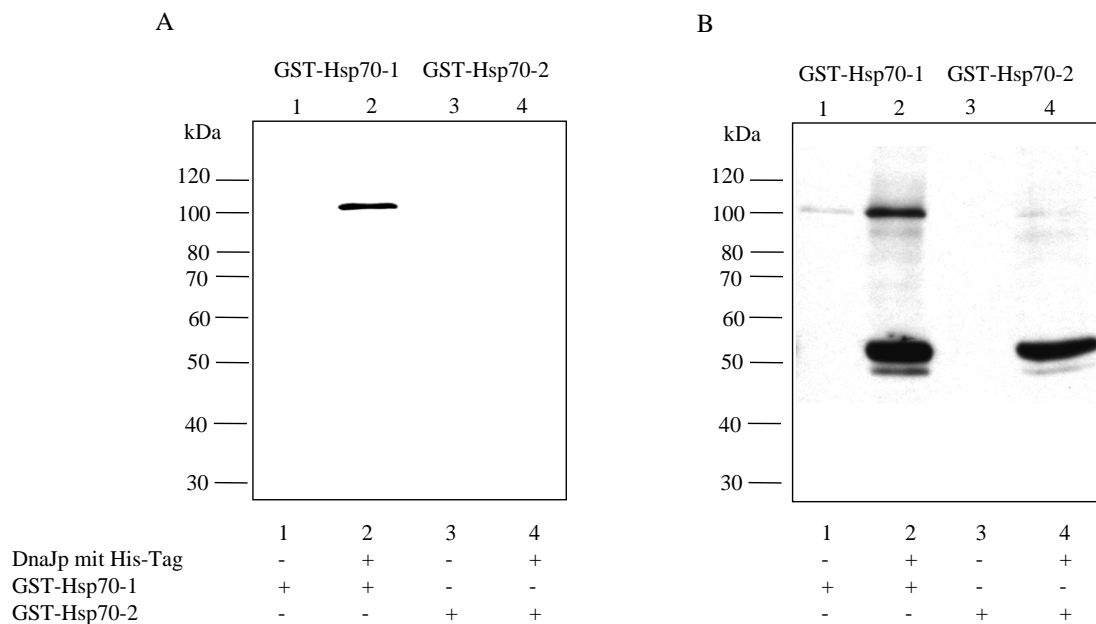
Offensichtlich bindet bei Anwesenheit von 2 mM ADP sowohl während der Komplexbildung als auch während des gesamten Waschvorganges nur die Isoform 1 der beiden cytosolischen Hsp70 an His-DnaJp (**Bahn 2**). Wenn anstatt 2 mM ADP 2 mM ATP sowohl während der Komplexbildung als auch während des gesamten Waschvorganges anwesend sind, kommt es nicht zur Ausbildung eines stabilen Komplexes zwischen den beiden Proteinen und das Hsp70-1-Translatat kann nicht mehr in der Fraktion der eluierten Proteine detektiert werden (**Bahn 3**). Beide radioaktiv markierten Proteine binden nicht unspezifisch an das  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Material (**Bahn 1** und **4**). Die Isoform 2 zeigte unter den Bedingungen, wo es zur

Ausbildung des stabilen Komplexes zwischen der Isoform 1 und His-DnaJp kommt, keine Affinität zum His-DnaJp (**Bahn 5**). Dieses Experiment lieferte erste Hinweise dafür, daß die Isoform 1 des cytosolischen Hsp70 das Partnerprotein des DnaJp aus Gurke zu sein scheint.

Von den anderen radioaktiv markierten Hsp70 aus Gurke und auch von den verschiedenen cytosolischen Hsp70 aus anderen Organismen (vgl. **3.2.3**) konnte keine Bindung an His-DnaJp festgestellt werden (kein Bild).

### 3.3.3 Nachweis der Wechselwirkung zwischen GST-Hsp70-1 und His-DnaJp

In einem analogen Versuchsansatz wurden anstatt der radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-Isoformen die beiden Hsp70-GST-Fusionsproteine verwendet. Die nach den Waschschritten noch am Affinitätsmaterial immobilisierten Proteine wurden mit 250 mM Imidazol eluiert, eine SDS-Page durchgeführt, anschließend die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und die verschiedenen Reaktionsansätze in einer Immunanfärbung gegen cytosolische Hsp70 auf die Anwesenheit der beiden Hsp70-Isoformen untersucht:



**Abb. 3.16: Nachweis der Wechselwirkung zwischen den Fusionsproteinen GST-Hsp70-1 und His-DnaJp durch Bindung des binären Komplexes an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätsmaterial**

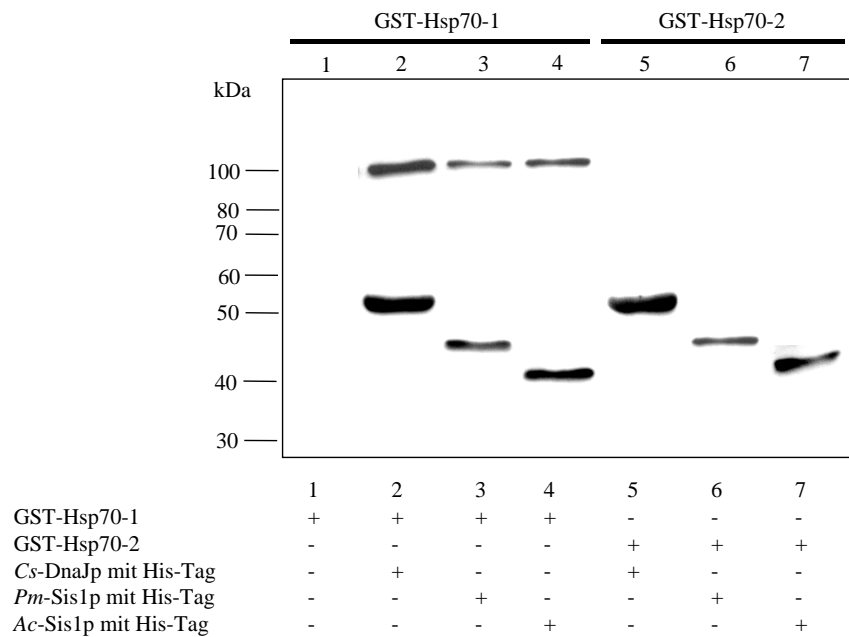
Die beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen wurden als GST-Fusionsproteine bakteriell exprimiert und an GSH-Agarose aufgereinigt. 5  $\mu\text{M}$  GST-Hsp70-Fusionsprotein wurden mit 10  $\mu\text{M}$  gereinigtem His-DnaJp in Anwesenheit von 2 mM ADP für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (10000 x g, 4°C) wurden die Überstände zu 20  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose pipettiert und 20 Minuten bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Affinitätsmaterial mit 6 ml Waschlösung mit 2 mM ADP gewaschen, die gebundenen Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert und nach SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferiert. Die Immunanfärbung erfolgte mit Antiserum gegen cytosolische Hsp70 (A) bzw. mit Antiserum gegen cytosolische Hsp70 und DnaJp (B).



Auch mit den Hsp70-GST-Fusionsproteinen ergibt sich das gleiche Bild, wie bereits mit den radioaktiv markierten Proteinen (3.3.2). Nur das GST-Fusionsprotein der cytosolischen Isoform 1 bindet bei Anwesenheit von 2 mM ADP an His-DnaJp (**Bahn 2**). Die Isoform 2 konnte unter denselben Bedingungen keinen stabilen Komplex mit dem Co-Chaperone ausbilden (**Bahn 4**). Genauso wie die radioaktiv markierten Hsp70-Isoformen binden auch die beiden GST-Fusionsproteine nicht unspezifisch an das Affinitätsmaterial (**Bahn 1 und 3**).

### 3.3.4 Nachweis der Wechselwirkung zwischen GST-Hsp70-1 und Sis-Proteinen

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob andere DnaJ-Protein ebenfalls eine Wechselwirkung mit cytosolischen Isoformen von Hsp70 eingehen können. Hierzu wurden in einem analogen Versuchsansatz anstatt des DnaJp aus Gurke Sis-Proteine aus zwei pilzlichen Organismen verwendet.



**Abb. 3.17: Nachweis der Wechselwirkung zwischen GST-Hsp70-1 und verschiedenen DnaJ-Proteinen durch Bindung des binären Komplexes an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätsmaterial**

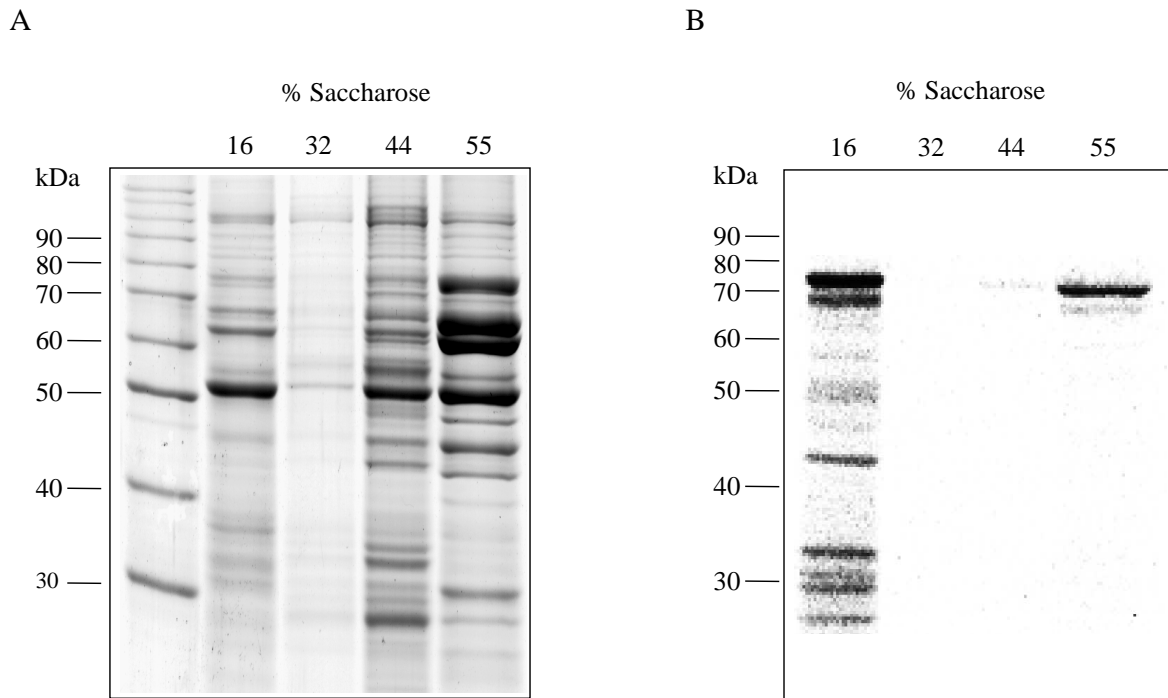
Gereinigte GST-Hsp70-Fusionsproteine (5  $\mu\text{M}$ ) wurden mit 10  $\mu\text{M}$  gereinigtem His-DnaJp, 5  $\mu\text{M}$  gereinigtem *Pm*-Sis1p bzw. 4  $\mu\text{M}$  *Ac*-Sis1p in Anwesenheit von 2 mM ADP für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (10000 x g, 4°C) wurden die Überstände zu 20  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose pipettiert und 20 Minuten bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Affinitätsmaterial mit 6 ml Waschpuffer mit 2 mM ADP gewaschen, die gebundenen Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert und nach SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferiert. Die Immunanfärbung erfolgte mit Antiserum gegen cytosolische Hsp70, mit Antiserum gegen den His-Tag (anti-RGSHHHH-Epitop) und mit Antiserum gegen *Ac*-Sis1p (Specht, 1997).

Die Isoform 1 des Hsp70-GST-Fusionsproteins bindet neben dem His-DnaJp aus Gurke (**Bahn 2**) offensichtlich auch an heterologe Sis-Proteine. Sowohl mit dem Sis1p aus der Ölhefe *Apiotrichum curvatum*, als auch mit dem Sis1p aus dem Oomyceten *Phytophthora megasperma* kann ausschließlich die Isoform 1 der beiden cytosolischen Hsp70 einen stabilen Komplex ausbilden (**Bahn 3 und 4**). Die Isoform 2 bindet unter identischen Bedingungen mit keinem der DnaJ-Proteine einen stabilen Komplex aus (**Bahn 5,6,7**).

Eine unspezifische Bindung des GST-Hsp70-1-Fusionsproteins an bakteriell exprimierte His-getaggte Fusionsproteine konnte ausgeschlossen werden, da unter identischen Bedingungen keine Bindung des GST-Hsp70-1 an andere bakteriell exprimierte und gereinigte His-Fusionsproteine aus verschiedenen Organismen festgestellt werden konnte. Getestet wurde die Bindung an eine Lipidkörper-Lipoxygenase aus Gurke (freundlicherweise von C. May überlassen), an Sina aus *Vitis vinifera* (freundlicherweise von M. Korfei überlassen) und an ein 1433-Protein aus *Phytophthora megasperma* (freundlicherweise von A. Binnewies überlassen). Bei keinem der verwendeten Fusionsproteine konnte eine Bindung der beiden GST-Hsp70-Fusionsproteine festgestellt werden (kein Bild).

### 3.3.5 Nachweis der Bindung von Hsp70-1-Translatat an Glyoxysomen

In den bisherigen Wechselwirkungsexperimenten wurden ausschließlich bakteriell exprimierte, lösliche DnaJ-Proteine verwendet. Das DnaJp aus Gurke liegt jedoch größtenteils membrangebunden an der cytosolischen Seite von Glyoxysomen in der Zelle vor. In einem Bindungsexperiment mit intakten Glyoxysomen als Quelle des DnaJp sollte untersucht werden, ob die beobachtete Komplexbildung zwischen löslichem His-DnaJp und der cytosolischen Isoform 1 von Hsp70 auch mit der auf Glyoxysomen verankerten Form des DnaJp stattfindet. Hierzu wurde das 12000 x g Pellet einer Zellfraktionierung als Glyoxysomen-Quelle verwendet und mit radioaktiv markiertem Hsp70-1 bei Anwesenheit von 2 mM ADP inkubiert. Die Glyoxysomen wurden durch Gleichgewichtsdichtezentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten bei Anwesenheit von 2 mM ADP von Mitochondrien und Plasmamembranvesikeln abgetrennt. Mit den verschiedenen Fraktionen des Gradienten wurden eine SDS-Page durchgeführt und die Radioaktivität des Hsp70-1 durch Autoradiographie detektiert.



**Abb. 3.18: Nachweis der Bindung von Hsp70-1-Translatat an Glyoxysomen**

Das 12000 x g Pellet einer Aufarbeitung von Gurkenkotyledonen, welches hauptsächlich aus Mitochondrien, Glyoxysomen und Plasmamembranvesikeln besteht, wurde in Anwesenheit von 2 mM ADP mit *in vitro* translatiertem und radioaktiv markiertem Hsp70-1 inkubiert. Das radioaktiv markierte Hsp70-1 war zuvor in Bindungspuffer umgepuffert worden, wodurch auch gleichzeitig das ATP-Regenerationssystem des Retikulozytenlysats inaktiviert wurde (Abtrennen des Creatinphosphates). Die Zellorganellen wurden durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten mit 2 mM ADP fraktioniert.

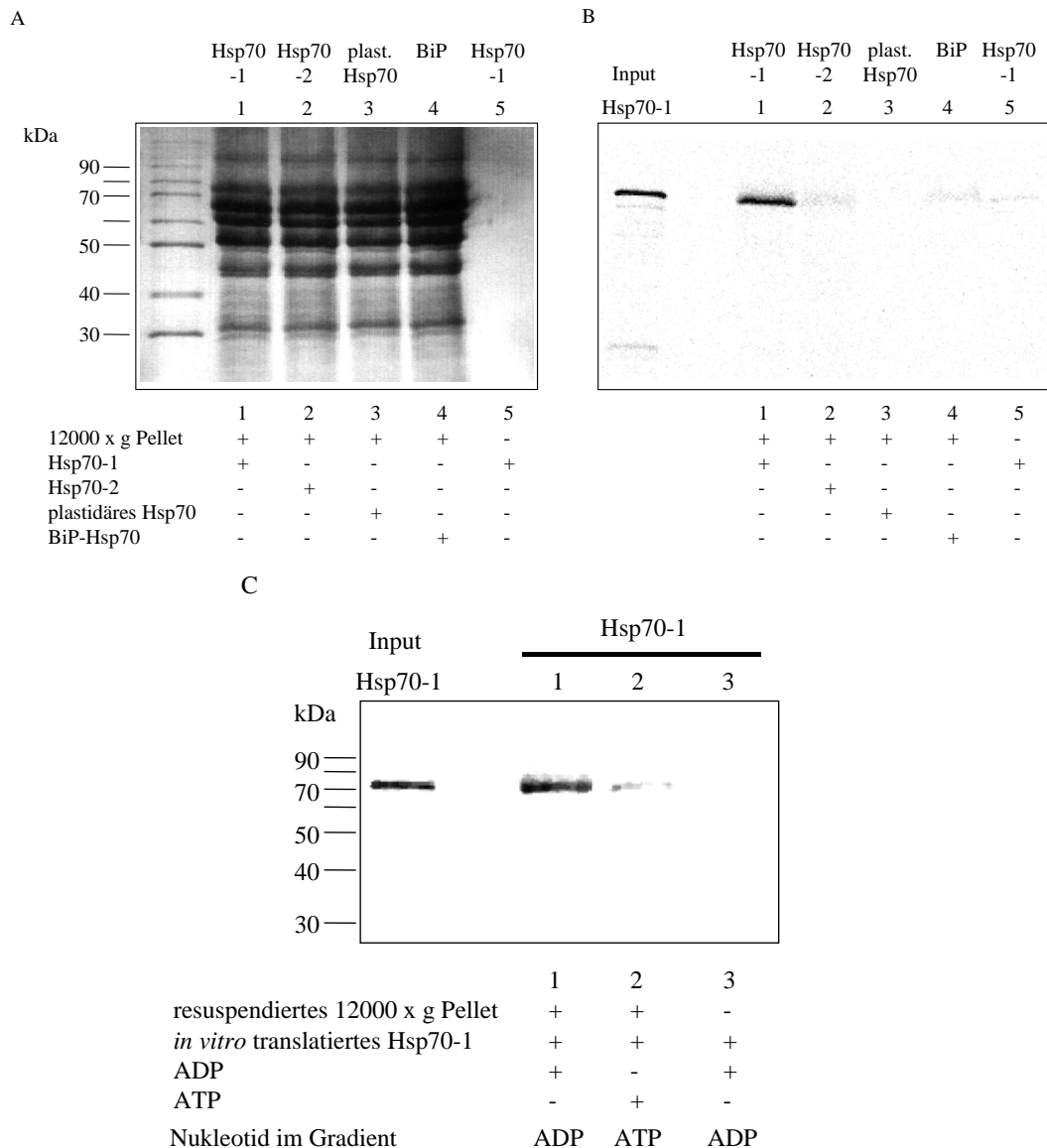
(A) Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gleichen Anteilen der verschiedenen Fraktionen des Gradienten. Auftragsstelle (16 % Saccharose), Plasmamembranvesikel (32 % Saccharose), Mitochondrien (44 % Saccharose) und Glyoxysomen (55 % Saccharose).

(B) Radioaktivität, die mit den Zellorganellen in den verschiedenen Fraktionen cosedimentiert ist.

Radioaktivität des cytosolischen Hsp70-1 findet sich neben der Auftragstelle (ca 16 % Saccharose) ausschließlich bei ca. 55 % Saccharose, was ungefähr der Gleichgewichtsdichte von Glyoxysomen entspricht. In den anderen Fraktionen des Gradienten konnte keine Radioaktivität detektiert werden. Die saubere Abtrennung der Glyoxysomen von anderen Zellorganellen erkennt man deutlich in der Proteinfärbung der verschiedenen Fraktionen. In der Fraktion bei ca. 55 % Saccharose sind neben den markanten Proteinen der Glyoxysomen keine Proteine der Mitochondrienfraktion (z.B. bei ca. 28 kDa und ca. 34 kDa) zu erkennen. Die Bindung des cytosolischen Hsp70-1 ist offensichtlich auf Glyoxysomen beschränkt.

Ob für diese Bindung eine Wechselwirkung mit dem glyoxysomalen DnaJp verantwortlich ist, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Hierzu wurde die Affinität von Glyoxysomen in Anwesenheit von ADP bzw. ATP zu verschiedenen Isoformen von Hsp70 analysiert. Die Menge der verschiedenen radioaktiv markierten Hsp70 wurde zuvor an einem Bioimager quantifiziert, um sicherzustellen, daß in den verschiedenen Bindungsexperimenten jeweils gleiche Mengen an radioaktiv markiertem Protein eingesetzt wurden. Gleiche Radioaktivitätsmengen der verschiedenen Hsp70-Isoformen aus Gurke wurden anschließend mit

gleichen Mengen von resuspendiertem 12000 x g Pellet einer Gurkenaufarbeitung in Anwesenheit von 2 mM ADP inkubiert und die Glyoxysomen durch Gleichgewichtsdichtezentrifugation isoliert. Mit gleichen Aliquots der Glyoxysomenfraktion wurde eine SDS-Page durchgeführt und die Radioaktivität durch Exposition mit einer Imagerplatte detektiert.



**Abb. 3.19: Vergleich der Affinität von Glyoxysomen in Anwesenheit von ADP/ATP zu verschiedenen Isoformen von Hsp70**

In Anwesenheit von 2 mM ADP wurden verschiedene Isoformen von Hsp70 unabhängig voneinander mit resuspendiertem 12000 x g Pellet inkubiert. Für jedes Bindungsexperiment wurden gleiche Mengen an radioaktiv markiertem Hsp70 verwendet. Nach einer Gleichgewichtsdichtezentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten in der Gegenwart von 2 mM ADP wurde die Fraktion der Glyoxysomen entnommen und die Proteinzusammensetzung analysiert (A, Coomassie-Anfärbung). Der Anteil des cosedimentierten, radioaktiven Hsp70s wurde durch Exposition mit einer Imagerplatte ermittelt (B). Eine stabile Wechselwirkung zwischen der cytosolischen Isoform 1 von Hsp70 und Glyoxysomen konnte nur bei Anwesenheit von 2 mM ADP festgestellt werden, da bei Anwesenheit von 2 mM ATP sowohl während der Inkubation des radioaktiv markierten Hsp70 mit dem resuspendierten 12000 x g Pellet als auch im Gradientenpuffer die Menge an cosedimentiertem Hsp70 deutlich geringer war (C, Bahn 2).

Es zeigte sich, daß nur die Isoform 1 der cytosolischen Hsp70 bei Anwesenheit von 2 mM ADP sowohl während der Inkubation mit den Glyoxysomen als auch im Gradienten während der Gleichgewichtsdichtezentrifugation an Glyoxysomen gebunden werden konnte (**Bahn 1, B**). Das radioaktiv markierte Protein konnte ohne Zusatz von resuspendiertem 12000 x g Pellet nach der Zentrifugation nicht in der Glyoxysomenfraktion detektiert werden (**Bahn 5, B**). Die Isoform 2 der cytosolischen Hsp70, das plastidäre Hsp70 und das BiP-verwandte Hsp70 ließen sich während der Gleichgewichtsdichtezentrifugation in Anwesenheit von 2 mM ADP mit Glyoxysomen nicht cosedimentieren (**Bahn 2, 3, 4, B**). Offensichtlich bindet analog zu den Bindungsexperimenten mit löslichem His-DnaJp nur die Isoform 1 der cytosolischen Hsp70 an Glyoxysomen. Zur Ausbildung einer dauerhaften Affinität des radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-1 zu Glyoxysomen war die Anwesenheit von 2 mM ADP absolut notwendig, da bei Anwesenheit von 2 mM ATP sowohl während der Inkubation des radioaktiv markierten Hsp70 mit dem resuspendierten 12000 x g Pellet als auch im Gradientenpuffer die Menge an cosedimentiertem Hsp70 deutlich geringer war (vgl. **Bahn 1 und 2, C**).

Die Tatsache, daß in Analogie zu den Wechselwirkungsexperimenten mit löslichem His-DnaJp nur die Isoform 1 der cytosolischen Hsp70 an Glyoxysomen bindet und diese Bindung strikt ADP-abhängig ist, läßt vermuten, daß die Affinität des Hsp70-1 zu Glyoxysomen über eine Wechselwirkung mit dem membrangebundenen DnaJp auf der cytosolischen Seite der Glyoxysomen zustande kommt. Um diese Vermutung zu untermauern wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

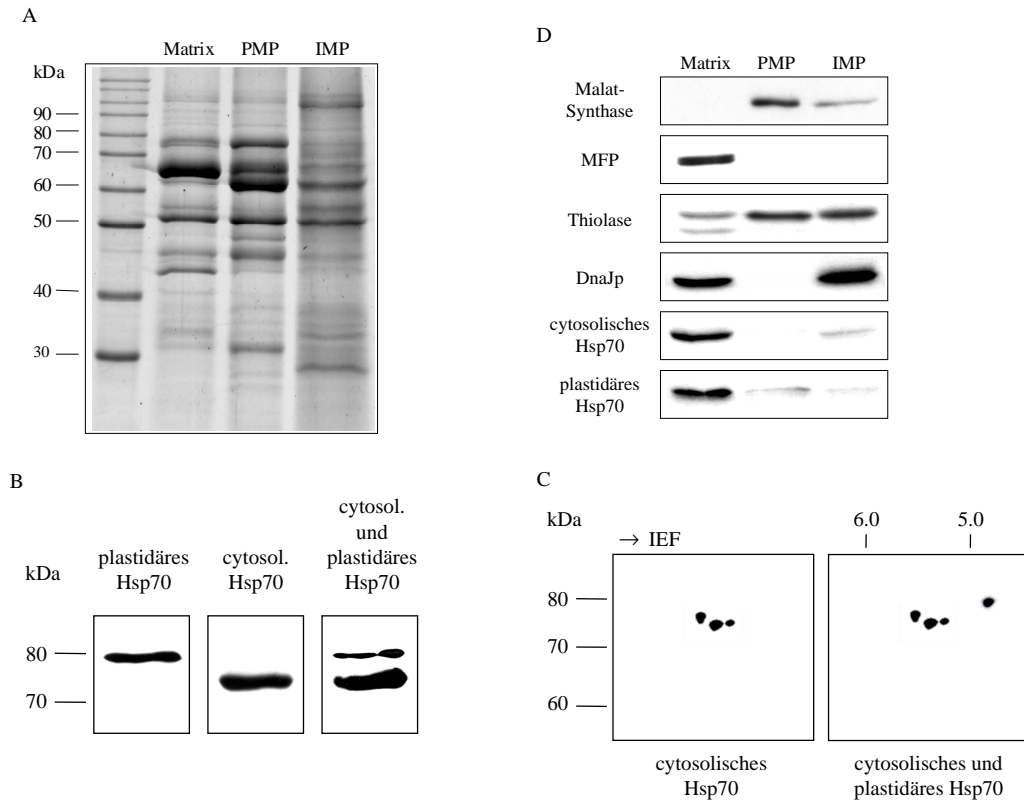
In einem Experiment wurde das radioaktiv markierte cytHsp70-1 in Anwesenheit von 2 mM ADP mit bakteriell exprimiertem, löslichen His-DnaJp vorinkubiert, sodaß es zur Ausbildung eines stabilen Komplexes zwischen His-DnaJp und cytHsp70-1 kam. Das komplexierte cytHsp70-1 sollte dadurch nicht mehr zur Bindung an das glyoxysomale DnaJp zur Verfügung stehen und demzufolge sollte die Menge des mit den Glyoxysomen cosedimentierbaren, radioaktiv markierten Proteins geringer sein. Dieser Ansatz wurde dann mit dem resuspendierten 12000 x g Pellet inkubiert. Nach Isolierung der Glyoxysomen wurde die Menge an cosedimentiertem cytHsp70-1 mit einem Reaktionsansatz verglichen, bei welchem keine Vorinkubation mit löslichem His-DnaJp stattgefunden hatte. Bei der Durchführung des Experimentes konnte jedoch kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden. In einigen Fällen war in Reaktionsansätzen, in denen lösliches His-DnaJp zugesetzt worden war, zwar weniger radioaktives Hsp70-1 cosedimentierbar als bei vergleichbaren Reaktionsansätzen ohne löslichem His-DnaJp, jedoch war der beobachtete Effekt nur sehr gering. Trotz Zugabe von löslichem His-DnaJp in großem Überschuß gegenüber dem radioaktiv markierten cytHsp70-1, konnte lediglich eine Abnahme des cosedimentierten Hsp70-1 um maximal 20 % festgestellt werden. Problematisch war, daß in einigen Fällen bei Zusatz des löslichen His-DnaJp sogar bis zu 20 % mehr radioaktiv markiertes cytHsp70-1 mit Glyoxysomen cosedimentiert werden konnte, als bei Reaktionsansätzen ohne Zusatz von His-DnaJp. Dieses Experiment konnte somit keine eindeutigen Hinweise liefern.

In einem anderen Experiment wurde versucht, das auf den Glyoxysomen lokalisierte DnaJp mit Antikörpern gegen das lösliche DnaJp abzusättigen, um hierdurch die Bindung des radioaktiv markierten cytHsp70-1 an so behandelte Glyoxysomen zu reduzieren. Trotz Variation der verwendeten Mengen an Antiserum und unterschiedlich langen Inkubationszeiten des Antiserums mit dem resuspendierten 12000 x g Pellet konnte keine signifikante Reduktion des gebundenen cytHsp70-1 festgestellt werden.

Obwohl viele Befunde für eine Wechselwirkung des glyoxysomalen DnaJp mit der Isoform 1 eines cytosolischen Hsp70 sprechen (s. o.), konnte ein direkter Nachweis hierfür nicht erbracht werden.

### **3.4 Analyse der Isoformen von Hsp70 in Glyoxysomen**

Es konnte gezeigt werden, daß ein cytosolisches Hsp70 bei Anwesenheit von ADP an Glyoxysomen gebunden werden kann. Bei Abwesenheit von ADP wurde das exogene Hsp70 vollständig von Glyoxysomen entfernt (3.3.5). Trotzdem konnten in Glyoxysomen, die in Abwesenheit von ADP isoliert wurden, Hsp70-Isoformen detektiert werden. Um die genaue Lokalisation von Hsp70 in Glyoxysomen zu untersuchen, wurden Proteine von hochgereinigten Glyoxysomen in eine Matrixfraktion, eine Fraktion der membran-assoziierten Proteine und eine Fraktion der integralen Membranproteine subfraktioniert. Zur Kontrolle der Qualität der Fraktionierung wurden die einzelnen Subfraktionen mit Antiseren gegen verschiedene Markerproteine untersucht.



**Abb. 3.20: Analyse von Glyoxysomen: Nachweis von 2 Isoformen von Hsp70 in der Matrix**

Über einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten gereinigte Glyoxysomen von 2.5 Tage alten Kotyledonen wurden in Matrixproteine (Matrix), periphere Membranproteine (PMP) und integrale Membranproteine (IMP) subfraktioniert (2.12.2). Die Qualität der Subfraktionierung wurde durch Western-Blot Analyse gegen Markerproteine der Matrix (multifunktionelles Protein, MFP) und die peripheren Membranproteine (Malat-Synthase, MS) überprüft.

(A) Coomassie-Anfärbung

(B) Western-Blot Analyse der Matrixproteine mit Antiseren gegen das plastidäre, stromale Hsp70 bzw. gegen cytosolische Hsp70. In der Doppelanfärbung mit beiden Antiseren erkennt man deutlich einen Größenunterschied zwischen den detektierten Proteinen.

(C) Western-Blot Analyse eines 2D-Gels einer Präparation von cytosolischen Proteinen (100000 x g Überstand) mit Antiseren gegen das plastidäre, stromale Hsp70 bzw. gegen cytosolische Hsp70. In der Doppelanfärbung erkennt man die Spezifität der beiden Antiseren für die verschiedenen Hsp70-Isoformen.

(D) Western-Blot Analyse der Subfraktionen mit verschiedenen Antiseren.

In der Protein-Anfärbung (3.20 A) sind alle markanten Enzyme, die in der Matrix (Isocitrat-Lyase) oder der Fraktion der peripheren Membranproteine (Malat-Synthase) zu erwarten sind, zu erkennen. Die Immunanfärbung der Subfraktionen mit Antiseren gegen Malat-Synthase und das multifunktionelle Protein (MFP, Matrix) bestätigt die Qualität der Subfraktionierung. In der Matrixfraktion konnten zwei verschiedene Hsp70-Isoformen nachgewiesen werden (3.20 D). Die beiden Isoformen zeigten eine unterschiedliche apparente molekulare Masse (72 kDa und 78 kDa) und hatten verschiedene isoelektrische Punkte (pI 4.9 für die größere Isoform und pI ~ 5.4 für die 72 kDa-Isoform). Desweiteren konnten die beiden Isoformen durch zwei monospezifische Antiseren unterschieden werden. Die Spezifität der beiden Antiseren wurde an einer Präparation von Proteinen des 100000 x g Überstands einer Zellfraktionierung

untersucht. Das Antiserum gegen den C-Terminus eines cytosolischen Hsp70 erkennt auf dem Blot eines 2D-Gels 3 Spots. Mit dem Antiserum gegen das plastidäre Hsp70 wird ein einziger Spot mit einer Größe von ca. 78 kDa und einem pI-Wert von ca. 4.9 detektiert (**3.20 C**). In einem anderen Experiment wurde die molekulare Masse der beiden Hsp70-Isoformen in der Matrix der Glyoxysomen genauer untersucht (**3.20 D**).

Neben dem auf der cytosolischen Seite der Glyoxysomen verankerten DnaJp, welches sich bei Solubilisierungsversuchen wie ein integrales Membranprotein verhält, gibt es eine lösliche Form des DnaJp in der Matrix der Glyoxysomen (**3.20 D**).

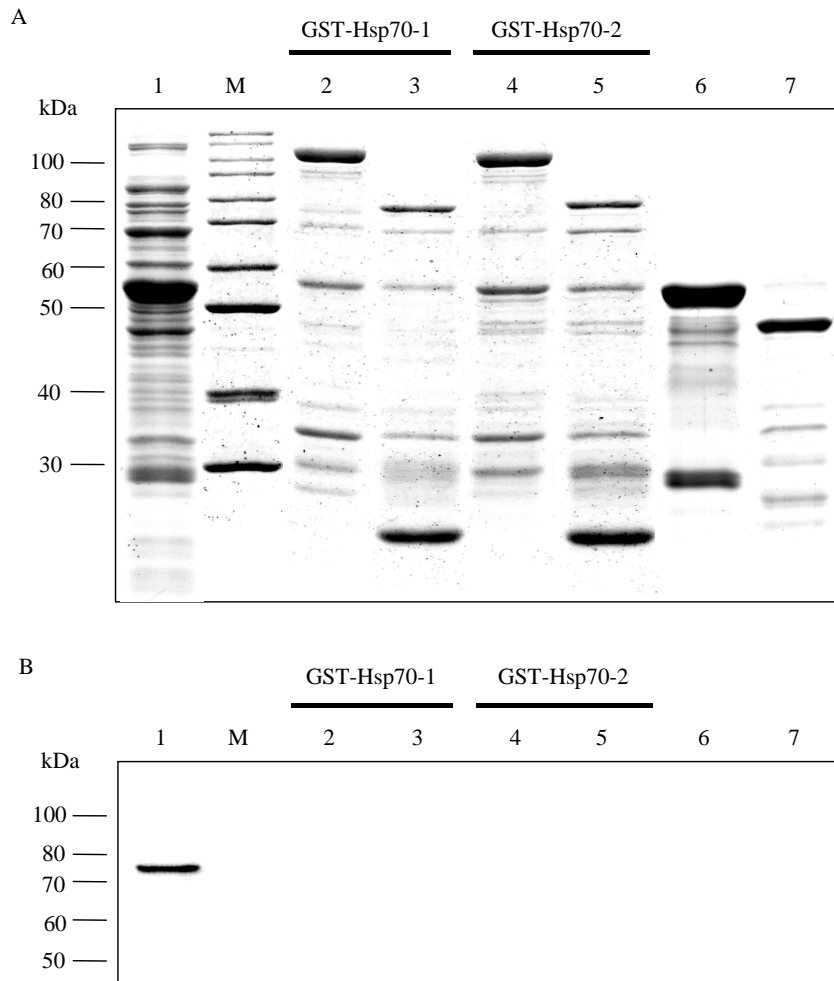
### **3.5 Zusätzliche Belege für die Wechselwirkung zwischen Hsp70-Isoformen und DnaJ-Proteinen durch Analyse der Hsp70-ATPase-Aktivität**

Bei Proteinen der Hsp70-Familie ist die Bindung und Freisetzung von Substrat-Polypeptiden an die Bindung und Hydrolyse von ATP gekoppelt (Wilbanks *et al.*, 1994). Durch Wechselwirkung mit DnaJ-Proteinen wird die ATPase-Aktivität von Hsp70s deutlich gesteigert (Minami *et al.*, 1996). Der Einfluß von DnaJ-Proteinen auf die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 aus Gurke sollte untersucht werden. Hierzu wurden die beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen als GST-Fusionsproteine bakteriell exprimiert und gereinigt. Neben der löslichen Form des His-DnaJp aus Gurke wurde auch der Einfluß von Sis1p aus dem Oomyceten *Phytophthora megasperma* auf die ATPase-Aktivität der beiden Hsp70-Isoformen untersucht.

#### **3.5.1 Untersuchung der für die ATPase-Tests verwendeten gereinigten Fusionsproteine auf Abwesenheit von DnaK**

Die verschiedenen, bakteriell exprimierten und gereinigten Fusionsproteine wurden auf die Abwesenheit von DnaK getestet, da eine Verunreinigung mit dem Hsp70-Homologen aus *E. coli*, aufgrund der hohen ATPase-Aktivität von DnaK, falsche Werte für die beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen liefern würde. Neben den beiden DnaJ-Proteinen und den beiden GST-Hsp70-Fusionsproteinen wurden auch die beiden mit der Protease Faktor Xa behandelten GST-Fusionsproteine ohne GST-Tag durch SDS-Page analysiert.





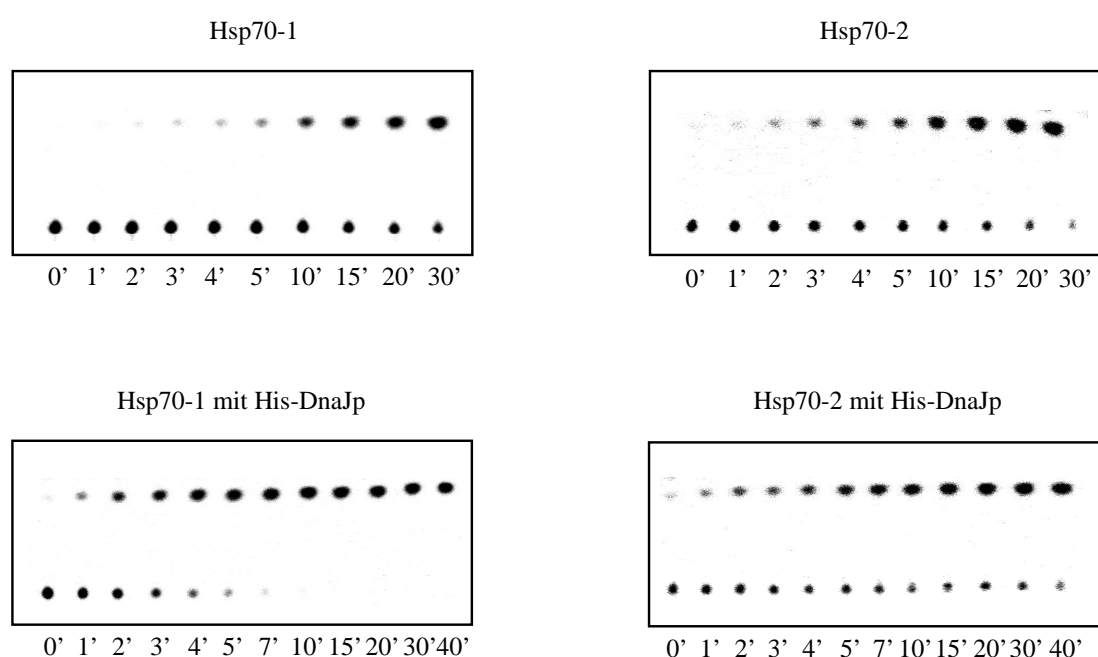
**Abb. 3.21: Untersuchung der für die ATPase-Tests verwendeten gereinigten, DnaK-freien Fusionsproteine**

Die für die ATPase-Tests verwendeten bakteriell exprimierten und gereinigten Fusionsproteine dürfen aufgrund der hohen ATPase-Aktivität von *E. coli* DnaK keine Verunreinigung mit diesem Protein aufweisen. Die gereinigten Fusionsproteine wurden deshalb in einem Western-Blot mit Antiserum gegen *E. coli* DnaK getestet. In **Bahn 1** wurde als Positivkontrolle des DnaK-Antikörpers bakterieller Extrakt einer Expression von His-DnaJp aufgetragen. In **Bahn 2 und 4** wurden die ungespaltenen GST-Hsp70-Fusionsproteine und in **Bahn 3 und 5** die mit Protease Faktor Xa behandelten GST-Hsp70-Fusionsproteine aufgetragen. In **Bahn 6** wurde bakteriell exprimiertes, gereinigtes His-DnaJp aus *Cucumis sativus* und in **Bahn 7** bakteriell exprimiertes, aufgereinigtes His-Sis1p aus *Phytophthora megasperma* aufgetragen. Nach der SDS-Page wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (**A**). (**B**) zeigt die Immunanfärbung des Western-Blots von (**A**) mit Antiserum gegen *E. coli* DnaK. **M**: 10 kDa Leiter von Lifetechnologies.

Die Proteinanfärbung (**3.21 A**) zeigt die bakteriell exprimierten und gereinigten Fusionsproteine. Als Positivkontrolle zur Detektion von DnaK wurde in Bahn 1 eine Probe bakteriellen Extraktes einer Expression von His-DnaJp aufgetragen. Die Immunanfärbung mit DnaK-Antiserum ergab nur bei der Positivkontrolle ein Signal. In den Proben der gereinigten Fusionsproteine konnte keine Verunreinigung mit DnaK festgestellt werden (**3.21 B**). Somit konnten die gereinigten Proteine für die ATPase-Tests verwendet werden.

### 3.5.2 Einfluß von His-DnaJp auf die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70

Die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 wurde bei 37°C bestimmt (O'Brien und McKay, 1995). Hierzu wurden die bakteriell exprimierte und gereinigte Hsp70-Fusionsprotein in einer Konzentration von 1 µM entweder mit oder ohne bakteriell exprimiertem und gereinigtem DnaJ-Protein inkubiert (2 µM). Durch Zugabe von 4.3 µCi [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol, Fa. Amersham), welches einer Konzentration von 40 nM entsprach (single turnover conditions), wurde die Reaktion gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen, eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt und die Bildung von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ADP mit einer Bioimager-Platte detektiert.

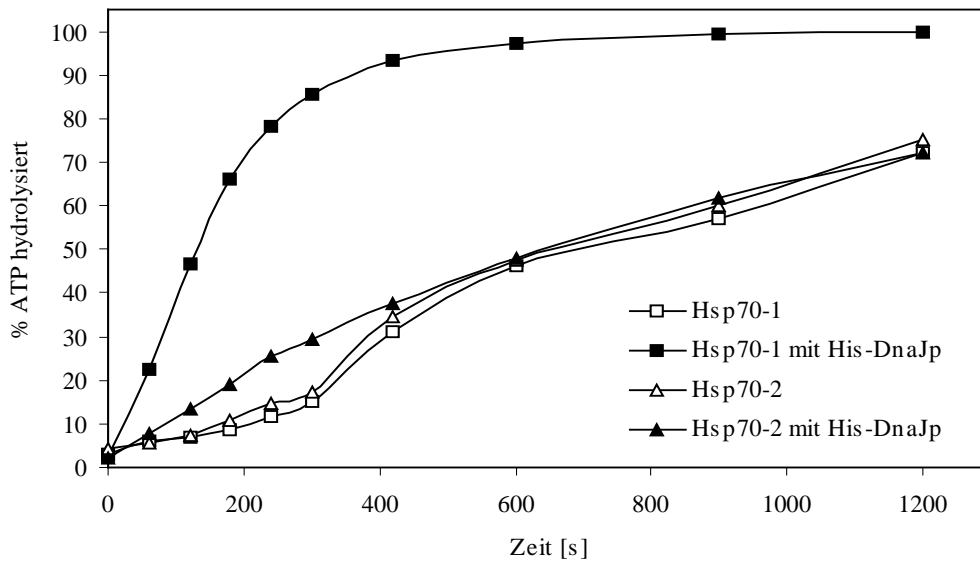


**Abb. 3.22: Einfluß von His-DnaJp auf die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70-Formen**

Die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70 wurde bei 37°C in Anwesenheit von 150 mM KCl gemessen (2.15). Hierzu wurden 4.3 µCi [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP (~40 nM) mit 1 µM bakteriell exprimiertem, gereinigtem GST-Hsp70 entweder ohne oder mit 2 µM His-DnaJp inkubiert. Aliquots wurden nach den angegebenen Zeitpunkten entnommen und 0.4 µl der gestoppten Reaktion auf einer Polyethylenimincellulose-DC-Platte aufgetragen. Nach beendeter Chromatographie wurden die Platten getrocknet und die Bildung von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ADP mit einer Bioimager-Platte detektiert.

Aus den Chromatogrammen wird der zeitliche Verlauf der ATP-Hydrolyse deutlich. Ohne Zugabe von His-DnaJp sind unter den gewählten Bedingungen nach 10 Minuten bei beiden Isoformen ca. 50 % des ATPs hydrolysiert worden. Bei Zugabe von 2 µM His-DnaJp zum Reaktionsansatz mit der Hsp70-Isoform 1 konnte eine Umsetzung von ca. 50 % ATP bereits nach 2 Minuten festgestellt werden. Dieser dramatische Anstieg in der ATP-Hydrolyse nach Zugabe von His-DnaJp konnte nur bei der Isoform 1 detektiert werden, bei der Isoform 2 war nur ein leichter Anstieg nach Zugabe von His-DnaJp festzustellen.

Die Mengenverhältnisse zwischen ATP und gebildetem ADP wurden für die verschiedenen Reaktionsansätze am Bioimager quantifiziert und die erhaltenen Daten graphisch dargestellt.



**Abb. 3.23: Graphische Auswertung der Messungen zur ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70**

Die bei der Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Radioaktivitätssignale von ATP und ADP wurden an einem Bioimager quantifiziert und die Mengenverhältnisse zwischen beiden Nukleotiden bestimmt.

In der graphischen Darstellung ist der Einfluß von His-DnaJp auf die ATPase-Aktivität der cytosolischen Hsp70-Isoform 1 ebenfalls deutlich zu erkennen.

Bei den Messungen der ATPase-Aktivität konnte bei beiden Hsp70-Isoformen kein Unterschied zwischen den GST-Fusionsproteinen und den mit Protease Faktor Xa behandelten Fusionsproteinen ohne GST-Tag festgestellt werden. Auch bei der Steigerung der ATPase-Aktivität in Anwesenheit von His-DnaJp konnte zwischen den GST-Fusionsproteinen und den Proteinen ohne GST-Tag kein Unterschied festgestellt werden.

### 3.5.3 Einfluß von *Pm*-Sis1p auf die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70

Bei den Wechselwirkungsexperimenten zwischen GST-Hsp70-Fusionsproteinen und Sis-Proteinen, war eine Komplexbildung zwischen GST-Hsp70-1 und den beiden heterologen Sis-Proteinen festgestellt worden (3.3.4). Bei der Messung der ATPase-Aktivität wurde deshalb auch der Einfluß von His-Sis1p aus *Phytophthora megasperma* auf die ATPase-Aktivität der beiden Hsp70-Isoformen untersucht. Hierbei wurde bei der Isoform 1 ebenfalls eine dramatische Steigerung in der ATPase-Aktivität festgestellt, vergleichbar mit der Steigerung durch His-DnaJp. Bei der Hsp70-Isoform 2 war keinerlei Einfluß von His-Sis1p zu beobachten. Auch bei den Messungen mit His-Sis1p aus *P. megasperma* konnten keine Unterschiede zwischen den GST-Fusionsproteinen und den Proteinen ohne GST-Tag festgestellt werden.

## 4 Diskussion

Zwei Gene, die für cytosolische Hsp70-Isoformen codieren, wurden aus Gurkenkotyledonen isoliert und charakterisiert. Die entsprechenden Genprodukte wurden biochemisch untersucht. Der strukturelle Aufbau der Gene wird im Folgenden näher besprochen und mit dem anderer pflanzlicher Hsp70-Gene verglichen.

### 4.1 Vergleich der Struktur von Genen für cytosolische Isoformen von Hsp70

Beide Gene, Hsp70-1 und Hsp70-2 (**Abb. 4.1**), enthalten ein Intron von 423 bp (Hsp70-1) bz.w 652 bp (Hsp70-2). In beiden Fällen befindet sich das Intron an einer hochkonservierten Stelle bei der Asparaginsäure Nummer 72.

Pflanzliche Hsp70-Gene mit Intron:

Ackerschmalwand (Wu *et al.*, 1988)

Mais (Rochester *et al.*, 1996)

Petunie (Winter *et al.*, 1988)

Pflanzliche Hsp70-Gene ohne Intron:

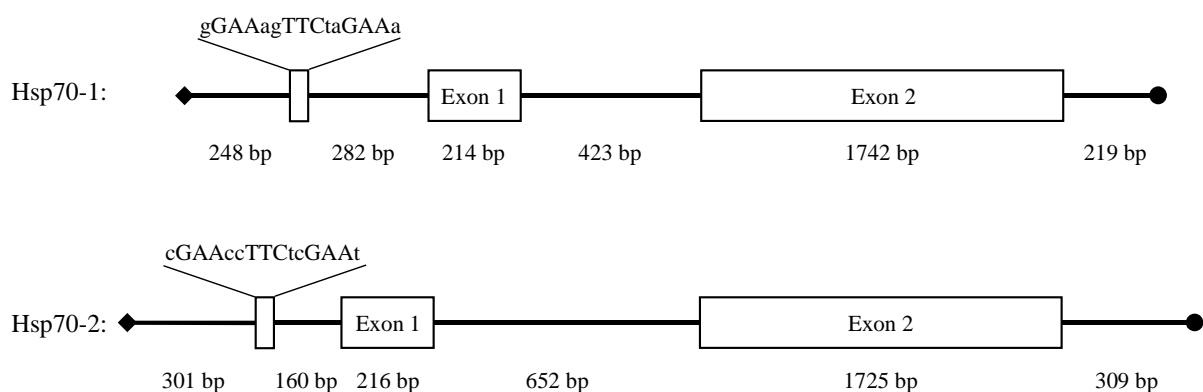
Karotte (Roberts und Key, 1991)

Sojabohne (Lin *et al.*, 1991)

Tomate (Lin *et al.*, 1991)

Für die meisten pflanzlichen Hsp70-Gene, die für cytosolische Isoformen codieren, ist ein Intron unterschiedlicher Größe an exakt dieser Stelle der Aminosäuresequenz gefunden worden (Rochester *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1988). Allerdings gibt es auch Hsp70-Gene, wie zum Beispiel aus Karotte, Sojabohne und Tomate, die kein Intron enthalten.

Die Intron-Exon-Übergänge der Hsp70-Gene aus Gurke enthalten die hochkonservierten Dinukleotide. Bei beiden Hsp70-Genen beginnt das Intron mit der Consensus-Sequenz 5'-GT-3' am 5'-Anfang des Introns und endet mit dem konservierten Dinukleotid 5'-AG-3' am 3'-Ende des Introns. Die vorhergesagten Stellen der Translations-Initiation stimmen mit der Regel von Kozak (Kozak, 1984) überein.



**Abb. 4.1: Struktur der Gene von zwei cytosolischen Isoformen von Hsp70 aus Gurke**

Die schematische Darstellung der beiden Gene zeigt den konservierten Aufbau mit jeweils zwei Exons und einem Heat Shock Element im Promotorbereich.

Neben der TATA-Box befinden sich im Promotorbereich der beiden Hsp70-Gene Sequenzmotive für die Bindung eines Heat Shock Factors (HSF). Ein solches Heat Shock Element (HSE) ist als eine Abfolge benachbarter, invertierter Pentamere mit der Sequenz 5'-NGAAN-3' beschrieben worden (Cunniff und Morgan, 1993). Die Abfolge dreier Pentamere stellt eine Bindungsstelle für ein HSF-Homotrimer dar (Fernandes *et al.*, 1994). Die HSE-Sequenzen im humanen Hsp40-Gen sind genauer charakterisiert worden und auch auf ihre Induzierbarkeit bei Hitzeschock getestet worden (Hata und Ohtsuka, 1998). Es zeigte sich, daß die Expression des humanen Hsp40 genauso wie zum Beispiel die Expression des DnaJp aus Gurke durch Hitzeschock gesteigert werden kann (Preisig-Müller *et al.*, 1994).

Die Tatsache, daß die cDNAs beider Hsp70-Gene aus Gewebe während eines frühen Stadiums der Keimung isoliert wurden, läßt vermuten, daß der Keimungsvorgang mit einer leichten Hitzeschock-Situation vergleichbar ist (DeRocher und Vierling, 1995). Möglicherweise handelt es sich jedoch auch um zwei konstitutiv exprimierte Hsp70-Isoformen, deren Expression durch Hitzeschock gesteigert werden kann. Hierzu wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Zwischen den Aminosäurepositionen 135 und 150 befindet sich die Sequenz AEAXLGXTXXNAVVTV, die für verschiedene pflanzliche Hsp70s als ATP-Bindungsstelle beschrieben wurde (Lin *et al.*, 1991). Neben der Consensus-Sequenz für eine ATP-Bindungsstelle findet sich in den Aminosäuresequenzen der beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen auch das für die cytosolischen Isoformen typische Sequenzmotiv EEVD am extremen C-Terminus (Freeman *et al.*, 1995).

Auffälligster Unterschied zwischen den Aminosäuresequenzen der beiden cytosolischen Isoformen sind zwei Aminosäuredeletionen bei der Isoform 2 im extremen C-Terminus. An zwei Stellen sind bei der Isoform 2 insgesamt fünf Aminosäuren deletiert, so daß sich ein Größenunterschied von 652 Aminosäuren der Isoform 1 zu 647 Aminosäuren der Isoform 2 ergibt. Freeman *et al.* (1995) konnten zeigen, daß das konservierte EEVD-Motiv am extremen C-Terminus der meisten cytosolischen Hsp70-Isoformen für die ATPase-Aktivität bzw. auch für die Steigerung der ATPase-Aktivität durch DnaJ-Proteine absolut notwendig ist. Somit scheint dieses Aminosäuremotiv wichtig zu sein für eine Interaktion zwischen Hsp70 und DnaJ-Proteinen. Eine Deletion des EEVD-Motivs führte zu einer dramatischen Änderung in der Gesamtstruktur des Proteins, was durch Messungen der Tryptophanfluoreszenz und dem unterschiedlichen Verhalten der verschiedenen Mutanten gegenüber der Protease Trypsin gezeigt werden konnte (Freeman *et al.*, 1995).

Man könnte vermuten, daß es durch die Aminosäuredeletionen bei der Isoform 2 zu größeren strukturellen Unterschieden zwischen Hsp70-1 und Hsp70-2 kommt, was die dramatischen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen in der Wechselwirkung mit DnaJ-Proteinen er-

klären könnte. Da es neben dem konservierten EEVD-Motiv noch andere Merkmale geben muß, die eine Wechselwirkung zwischen Hsp70 und DnaJ vermitteln ist offensichtlich, da beide Isoformen das konservierte EEVD-Motiv enthalten.

#### 4.2 Die cytosolische Hsp70-Isoform 1 als Wechselwirkungspartner von DnaJ-Proteinen

In Bindungsversuchen mit gereinigten His-DnaJ-Proteinen an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose konnte die cytosolische Hsp70-Isoform 1 in einem binären Komplex nachgewiesen werden. Dieser Komplex wurde eingehender untersucht durch die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen der auf der Außenseite von Glyoxysomen verankerten Form des DnaJp und verschiedenen Hsp70-Isoformen aus Gurke. Hierbei konnte eine strikt ADP-abhängige Bindung an die Oberfläche von Glyoxysomen nur bei der cytosolischen Hsp70-Isoform 1 beobachtet werden. Alle anderen untersuchten Hsp70-Isoformen aus Gurke zeigten keine Affinität gegenüber Glyoxysomen. Die Tatsache, daß eine stabile Komplexbildung nur in Anwesenheit von ADP nachgewiesen werden konnte steht im Einklang mit vielen Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Molekularen Chaperonen (Cyr, 1995; Laufen *et al.*, 1999; Miernyk *et al.*, 1992; Palleros *et al.*, 1991). Auch wenn es viele Unterschiede im ATP-Hydrolyse-Zyklus Molekularer Chaperone zwischen Prokaryonten und Eukaryonten gibt (Höhfeld, 1998; Mayer und Bukau, 1998), ist allen gemeinsam, daß sich Hsp70, DnaJ und das Substratpeptid in einem stabilen ternären Komplex befinden, wenn Hsp70 in der ADP-gebundenen Konformation vorliegt (Hartl, 1996). Durch Austausch des ADPs gegen ATP findet im Hsp70 eine drastische Konformationsänderung statt, die zum Zerfall des stabilen Komplexes und zur Freisetzung des Substratpeptids führt (Palleros *et al.*, 1993). Dieses Verhalten konnte auch bei den Bindungsexperimenten von cytHsp70-1 an Glyoxysomen beobachtet werden. In Anwesenheit von 2 mM ATP im Gradientenpuffer während der Gleichgewichtsdichtezentrifugation war die Menge an cosedimentierbarem radioaktiv markierten Hsp70-1 drastisch reduziert. Die ADP-abhängige und ATP-sensitive Wechselwirkung zwischen cytHsp70-1 und Glyoxysomen spricht dafür, daß in Analogie zu den Bindungsexperimenten mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose, die Bindung von cytHsp70-1 an Glyoxysomen durch eine Wechselwirkung mit dem auf der cytosolischen Seite verankerten DnaJp zustande kommt. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß cytHsp70-1 ausschließlich mit Glyoxysomen wechselwirkt und keine Bindung an Mitochondrien oder Plasmamembranvesikel beobachtet werden konnte.

Es wurden Experimente durchgeführt, die eine direkte Wechselwirkung zwischen cytHsp70-1 und dem glyoxysomalen DnaJp zeigen sollten. Hierzu wurde versucht, daß auf den Glyoxysomen lokalisierte DnaJp mit Antikörpern gegen das lösliche DnaJp abzusättigen. Hierdurch sollte eine Bindung des radioaktiv markierten cytHsp70-1 an solchermaßen behandelte Glyoxysomen signifikant reduziert werden, da das DnaJp dann nicht mehr für eine Wechselwirkung zugänglich sein sollte. Die Ergebnisse waren jedoch enttäuschend, da trotz einer Va-

riation der verwendeten Mengen an Antiserum und unterschiedlich langen Inkubationszeiten des Antiserums mit dem resuspendierten 12000 x g Pellet keine Abnahme an gebundenem cytHsp70-1 festgestellt werden konnte.

Das unerwartete Resultat dieses Experimentes könnte verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise wurde eine Wechselwirkung zwischen cytHsp70-1 und dem glyoxysomalen DnaJp durch die Antikörper nicht vollständig verhindert. Diese Möglichkeit erscheint sehr wahrscheinlich, da als Antigen bakteriell exprimiertes und elektroeluiertes His-DnaJ-Protein verwendet wurde. Somit könnten dem polyklonalen Antiserum Immunglobuline fehlen, die native Epitope des glyoxysomalen DnaJp erkennen können.

Eine andere Möglichkeit könnte darin bestehen, daß eine Wechselwirkung des cytHsp70-1 mit Glyoxysomen nicht ausschließlich über eine Bindung an das glyoxysomale DnaJp vermittelt wird. Man könnte sich vorstellen, daß Substratproteinkomplexe, die in die Matrix importiert werden sollen, für eine Signalsequenzerkennung durch die Signalsequenzerkennungsrezeptoren Pex5p und Pex7p zumindest im Bereich der Signalsequenzen in einer partiell entfalteten Konformation vorliegen müssen. Diese Funktion könnte von cytosolischen Hsp70s übernommen werden, so daß es nicht auszuschließen ist, daß das radioaktiv markierte cytHsp70-1 an einen membrangebundenen Komplex aus partiell entfaltetem Matrixprotein, den löslichen Signalsequenzerkennungsrezeptoren und dem membrangebundenen Importrezeptor Pex14p bindet. Diese Wechselwirkung würde selbstverständlich die gleichen Eigenschaften wie eine Wechselwirkung mit dem glyoxysomalen DnaJp haben, d. h. sie wäre ADP-abhängig und ATP-sensitiv.

Somit könnte man in diesem Fall nicht zwischen einer direkten Bindung des cytHsp70-1 an DnaJp und einer Bindung an membrangebundene Proteinkomplexe ohne Beteiligung von DnaJp unterscheiden.

Obwohl es nicht möglich war, eine direkte Wechselwirkung zwischen dem glyoxysomalen DnaJp und dem radioaktiv markierten cytHsp70-1 als Ursache für die Cosedimentation des radioaktiv markierten Proteins mit Glyoxysomen nachzuweisen, sprechen viele Hinweise dafür, daß die Affinität des Hsp70-1 zu Glyoxysomen über eine Wechselwirkung mit dem membrangebundenen DnaJp auf der cytosolischen Seite der Glyoxysomen zustande kommt.

- Erstes bindet in Einklang mit den Bindungsexperimenten mit löslichem His-DnaJp an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Material ausschließlich die cytosolische Isoform 1 an Glyoxysomen. Andere Isoformen von Hsp70 binden nicht an Glyoxysomen.
- Zweitens ist die Wechselwirkung des cytHsp70-1 auf Glyoxysomen beschränkt. An Zellorganellen, die kein DnaJp an der cytosolischen Seite ihrer Membran tragen, findet keine Bindung von cytHsp70-1 statt.
- Drittens ist die Wechselwirkung zwischen cytHsp70-1 und Glyoxysomen strikt ADP-abhängig und ATP-sensitiv.
- Viertens zeigte die Analyse der enzymatischen Eigenschaften der beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70, daß die ATPase-modulierende Aktivität des DnaJp bei der Isoform 1 am höchsten war.

Somit handelt es sich bei der cytosolischen Isoform 1 von Hsp70 offensichtlich um das Partnerprotein des glyoxysomalen DnaJ-Proteins.

Der Einfluß von verschiedenen DnaJ-Proteinen auf die ATPase-Aktivität der beiden cytosolischen Hsp70-Isoformen zeigte, daß das heterologe Sis1p aus *Phytophthora megasperma* die ATPase-Aktivität der Isoform 1 genauso stark steigern konnte wie das DnaJp aus *Cucumis sativus*. Offensichtlich besitzt die cytosolische Hsp70-Isoform 1 aus Gurke ähnliche Eigenschaften wie das Hsp70-Homologe Ssa1 aus Bäckerhefe, da Ssa1 im Gegensatz zum Ssb1/2 auch sowohl mit Sis1p als auch mit Ydj1p eine Wechselwirkung eingehen kann (Lu und Cyr, 1998). Somit könnten beide Proteine sowohl bei der Translation als auch beim Targeting/Import in das ER bzw. Peroxisomen eine wichtige Funktion übernehmen.

Aufgrund des ähnlichen Verhaltens von Ssa1 und der cytosolischen Hsp70-Isoform 1 aus Gurke könnten die Ergebnisse einer bereits durchgeführten genauen funktionellen Charakterisierung verschiedener Domänen von Ydj1p möglicherweise auf DnaJp und dessen Wechselwirkung mit cytHsp70-1 übertragbar sein (Lu und Cyr, 1998).

Daß Proteine der Hsp70-Familie mit mehreren, verschiedenen DnaJ-homologen Regulatorproteinen wechselwirken können zeigen auch Untersuchungen beim BiP, dem Hsp70-Homologen im ER. BiP kann mit zwei verschiedenen DnaJ-Proteinen innerhalb des Zellorga-



nells wechselwirken, nämlich sowohl mit Sec63p als auch mit Scj1p, jedoch nicht mit Sis1p oder Mdj1p (Schlenstedt *et al.*, 1995).

Durch die Bindungsversuche mit Hsp70-GST-Fusionsproteinen und gereinigten His-DnaJ-Proteinen an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose konnte gezeigt werden, daß offensichtlich keine weiteren Faktoren zur Ausbildung des binären Komplexes notwendig sind. Sowohl bei den Wechselwirkungsexperimenten zwischen His-DnaJp und dem 100000 x g Überstand einer Zellfraktionierung (Diefenbach, 1997) als auch bei der Verwendung von *in vitro* translatiertem cytHsp70-1 konnte die Anwesenheit unbekannter cytosolischer Faktoren in den Komplexen nicht ausgeschlossen werden. Da es zur Ausbildung eines binären Komplexes kommt, war nicht selbstverständlich, da bei der Regulation des humanen Hsp70-ATPase-Zyklus insgesamt fünf verschiedene Proteine bzw. Proteinfamilien identifiziert wurden (Ballinger *et al.*, 1999). Neben dem DnaJ-Homologen Hsp40 sind dies die Familie der BAG-Proteine (Bimston *et al.*, 1998; Höhfeld, 1998), von denen insgesamt fünf humane Vertreter charakterisiert wurden (Takayama *et al.*, 1999). Sie inhibieren die ATPase-Aktivität von Hsp70 durch Bindung an die ATPase-Domäne.

Das C-Terminus of Hsc70-interacting protein CHIP inhibiert ebenfalls die ATPase-Aktivität von Hsp70, jedoch durch Bindung an dessen C-Terminus (Ballinger *et al.*, 1999).

Eine ähnliche Funktion übernimmt auch das Hsc70-interacting protein Hip (Höhfeld *et al.*, 1995), welches den ADP-gebundenen Zustand von Hsp70 stabilisiert und eine wichtige Rolle in Hsc70/Hsp90-Chaperone-Komplexen zu spielen scheint (Prapapanich *et al.*, 1996).

Hierbei ist auch das Hsc70/Hsp90-organizing protein Hop von Bedeutung (Smith *et al.*, 1995), da es die Wechselwirkung zwischen Hsc70 und Hsp90 vermittelt (Chen *et al.*, 1996).

Ob die Regulation des Hsp70-ATPase-Zyklus in Pflanzen auch eine so große Anzahl an Co-faktoren benötigt ist unklar, da bisher außer verschiedenen DnaJ-Homologen keine Vertreter der anderen Proteinfamilien in Pflanzen identifiziert wurden.

#### 4.3 Nachweis von Hsp70-Isoformen in der Matrix von Glyoxysomen

In der Matrix von Glyoxysomen konnten zwei verschiedene Hsp70-Isoformen nachgewiesen werden. Die beiden Isoformen unterschieden sich in ihrer molekularen Masse (72 kDa und 78 kDa) und hatten verschiedene isoelektrische Punkte (pI 4.9 für die größere Form und ~ pI 5.4 für die 72 kDa-Form). Außerdem konnten sie mit monospezifischen Antisera unterschieden werden. Die kleinere Hsp70-Isoform konnte nur mit Antiserum gegen cytosolische Hsp70 detektiert werden und die größere Isoform nur mit Antiserum gegen die plastidäre Hsp70-Isoform.

Diese in der Matrix lokalisierten Proteine der Hsp70-Familie unterscheiden sich von den membrangebundenen Proteinen, die bisher an Peroxisomen identifiziert wurden. Als eines der am häufigsten vorkommenden peroxisomalen Membranproteine wurde ein 70 kDa großes Protein (PMP70) als Mitglied der Familie der ABC-Transporter identifiziert, dem eine Funktion beim Transport über die Peroxisomenmembran zugeschrieben wurde (Kamijo *et al.*, 1990). Die Insertion des radioaktiv markierten PMP70 in die Membran intakter Peroxisomen wurde in einem *in vitro* Import-Assay charakterisiert (Imanaka *et al.*, 1996).

In Glyoxysomen aus Gurke wurde ein 73 kDa-Membranprotein identifiziert (PMP73), das eine hohe Aminosäuresequenz-Homologie und immunochemische Kreuzreaktivität zu einem konstitutiv exprimierten cytosolischen Hsp70 aus Tomate aufweist (Corpas und Trelease, 1997).

Von Untersuchungen in Wassermelone ist bekannt, daß es in dieser Pflanze eine Hsp70-Isoform gibt, die sowohl in Proplastiden als auch in Peroxisomen importiert wird (Wimmer *et al.*, 1997). Das größere Protein besitzt eine N-terminale Präsequenz für die Chloroplasten und die verkürzte Form trägt eine N-terminale Präsequenz mit einem Targetingsignal für die Peroxisomen. Das in der längeren Präsequenz ebenfalls enthaltene Peroxisomen-Targeting-Signal wird offensichtlich vom peroxisomalen Importapparat nicht erkannt.

Es gibt Beispiele, wo ein Gen für Proteine codiert, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten eine Funktion übernehmen (Small *et al.*, 1998). Man kann hierbei hauptsächlich drei verschiedene Mechanismen unterscheiden.

In den meisten Fällen kommt es durch alternative Transkriptionsstartpunkte zu verschiedenen, unterschiedlich lokalisierten Proteinprodukten eines Genes. Vielen der Haushaltsgene fehlt die TATA-Box, die die Genauigkeit des Transkriptionsstarts festlegt, so daß man meist mehrere Transkriptionsstartpunkte bei Haushaltsgenen findet. Klassische Beispiele hierfür sind die Histidin- und Valin-tRNA-Synthetasegene aus Hefe, wobei die selteneren, längeren Transkripte mitochondriale Isoformen und die kürzeren häufiger vorkommenden Transkripte für die cytosolischen Isoformen codieren (Chatton *et al.*, 1988; Natsoulis *et al.*, 1986).

Bei einem anderen Mechanismus kommt es in seltenen Fällen durch alternatives Spleißen zur Ausbildung von Transkripten, die für Proteine mit verschiedenen Targetingsequenzen codieren. Das humane dUTPase-Gen beispielsweise codiert für eine kernlokalisierte Isoform und, falls durch alternatives Spleißen das Exon mit der mitochondrialen Targetingsequenz in der mRNA enthalten ist, zusätzlich für eine mitochondriale Isoform (Ladner und Caradonna, 1997).

Alternative Translationsstartpunkte spielen häufig bei pflanzlichen Genen mit unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation eine Rolle. Hierbei findet, ausgehend von einem mRNA-Transkript, die Initiation der Translation an zwei verschiedenen AUG-Sequenzen statt (Mireau *et al.*, 1996).

Die Tatsache, daß sich in der Präsequenz der Hsp70-Isoform aus Wassermelone ein ATG außerhalb des Leserasters zwischen den beiden verwendeten Startcodons befindet, deutet darauf hin, daß es in diesem Falle wahrscheinlich durch alternative Transkriptionsstartpunkte zu den unterschiedlich großen Proteinen mit verschiedener intrazellulärer Lokalisation kommt. Die Identifikation von zwei verschiedene Klassen von Transkripten untermauert diese Hypothese weiter (Wimmer *et al.*, 1997).

Der Vergleich der N-terminalen Präsequenz der charakterisierten Hsp70-Isoform aus Wassermelone mit der Präsequenz der Hsp70-Isoform aus Gurke mit der Signalsequenz für die Chloroplasten (cpHsp70, R. Preisig-Müller, unveröffentlicht) zeigt eine erstaunlich hohe Homologie:

```

MASSTVQIHGLGAPSFAAASMRKSNHVSSRTVFFGQKLGNSSAFPTATFLKLRNISRNRSSVRPLR
*GA**A*****N****S**********A**A**N****T*****

```

**Abb. 4.2: Vergleich der N-Termini zwischen den Hsp70-Isoformen aus Wassermelone und aus Gurke**

Dargestellt ist die 67 Aminosäuren lange N-terminale Präsequenz des Hsp70 aus Wassermelone, die verglichen wurde mit der Präsequenz des Hsp70 aus Gurke. \* markiert eine identische Aminosäure. Die Länge der Präsequenz wurde durch einen Vergleich mit bakteriellen Hsp70s ohne Präsequenz abgeleitet (Wimmer *et al.*, 1997). Das erste Methionin (M) entspricht dem Startmethionin des Proteins mit der Präsequenz für die Chloroplasten und das zweite unterstrichene Methionin (M) entspricht dem Startmethionin des Proteins mit der Präsequenz für die Peroxisomen. Das PTS2-Signal ist durch einen Kasten markiert. Die gesamte Aminosäuresequenz der beiden Hsp70s ist zu über 97 % homolog und zu über 96 % identisch.

Die N-terminalen Signalsequenzen der beiden Proteine sind so konserviert, daß man bei der Hsp70-Isoform aus Gurke ebenfalls das Targeting in zwei verschiedene Zellkompartimente erwarten müßte. Um diese Frage zu klären, wurden Glyoxysomen aus Gurke präpariert, die nahezu frei waren an Verunreinigungen mit Proplastiden. Eine Verunreinigung der Glyoxysomenpräparation mit Proplastiden kann nicht vollständig verhindert werden, da beide Zellorganellen die selbe Gleichgewichtsdichte haben. Durch geeignete Vorzentrifugationen kann jedoch der Anteil von Proplastiden, die in der Fraktion der Gradienten-gereinigten Glyoxysomen noch vorhanden sind stark verringert werden. Derart präparierte Glyoxysomen enthalten nur noch geringe Mengen an Proplastiden. Die Gradienten-gereinigten Glyoxysomen wurden subfraktioniert und die Qualität der Subfraktionierung wurde durch immunochemischen Nachweis verschiedener Markerproteine belegt. In der Matrixfraktion konnte mit zwei monospezifischen Antiseren für zwei verschiedene Hsp70-Isoformen in beiden Fällen ein Signal erhalten werden. Sowohl mit einem Antiserum gegen den C-Terminus cytosolischer Hsp70-Isoformen als auch mit einem Antiserum gegen die plastidäre Hsp70-Isoform konnten homologe Proteine detektiert werden. Beide Proteine konnten auch in ihrer Größe unterschieden werden. Durch einen direkten Vergleich der Signalintensitäten mit dem Antiserum gegen cytosolische Hsp70-Isoformen konnte ausgeschlossen werden, daß das beobachtete Signal mit

dem Antiserum gegen die plastidäre Hsp70-Isoform auf einer Verunreinigung der Gradientengereinigten Glyoxysomen mit Proplastiden zurückzuführen war.

Offensichtlich lassen sich die Ergebnisse von den Untersuchungen in Wassermelone auch auf die entsprechende Hsp70-Isoform in Gurke übertragen. Für einen eindeutigen Nachweis müßten mit der Hsp70-Isoform aus Gurke selbstverständlich die gleichen Targeting-Experimente in Hefe durch werden, da nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, daß das in der Matrixfraktion erhaltene Signal nicht auf eine Verunreinigung der Glyoxysomenpräparation mit Proplastiden zurückzuführen ist.

Mit dem Antiserum gegen DnaJp konnte neben der membranverankerten Form in der Fraktion der integralen Membranproteine auch in der Fraktion der Matrixproteine eine lösliche Form eines DnaJ-Proteins nachgewiesen werden. Das Vorkommen von verschiedenen Hsp70-Isoformen und einer löslichen Form eines DnaJ-Proteins in der Matrix von Glyoxysomen impliziert, genau wie bei den meisten anderen Zellorganellen auch (Mitochondrien, ER, Chloroplasten), die Notwendigkeit eines Proteinapparates aus Faltungshelferproteinen im Inneren von Glyoxysomen. Offensichtlich benötigen einige der Matrixproteine die Unterstützung von Molecular Chaperones für einen effizienten Import in Peroxisomen oder zur Ausbildung der korrekten Konformation in der Matrix nach dem eigentlichen Importvorgang durch die peroxisomale Membran.

Mit einem Antiserum gegen die  $\beta$ -Ketothiolase (Thiolase) aus Gurke sollte die Verteilung des Enzyms in den einzelnen Subfraktionen untersucht werden. Hierbei konnte man im Gegensatz zur Thiolase in Bäckerhefe (Glover *et al.*, 1994) in der Matrix von Glyoxysomen eine Prozessierung der Thiolase beobachten. Neben einer 49 kDa-Form mit Präsequenz, die ausschließlich in der Fraktion der peripheren und integralen Membranproteine vorlag, konnte in der Fraktion der Matrixproteine neben der unprozessierten 49 kDa-Form auch eine prozessierte 45 kDa-Form gefunden werden. Offensichtlich findet die Prozessierung erst nach dem vollständigen Import des Proteins in die Matrix statt und nicht bereits während der Translokation durch die Membran.

Im Einklang mit Untersuchungen von DeRocher und Vierling (1995) in Erbse konnten mit einem Antiserum gegen cytosolische Hsp70-Isoformen im 100000 x g Überstand einer Zellfraktionierung drei konstitutiv exprimierte cytosolische Hsp70-Isoformen in der 2D-Western-Blot-Analyse in Gurke detektiert werden (Diefenbach, 1997). Mit Antiserum gegen die plastidäre/peroxisomale Hsp70-Isoform konnte nur ein Spot in der 2D-Western-Blot-Analyse erhalten werden.

#### 4.4 Bedeutung von Molekularen Chaperonen beim Proteinimport in Peroxisomen

Der Transport kerncodierter Vorläuferproteine über die Organellen-Membran in Peroxisomen ist an die Hydrolyse von ATP gekoppelt (Olsen und Harada, 1995). Die Notwendigkeit von Proteinen der Hsp70-Familie für einen effizienten Proteinimport in Peroxisomen konnte durch *in vitro* Importversuche gezeigt werden (Walton *et al.*, 1994). Auch DnaJ-Proteine als Hsp70-Regulatorproteine übernehmen eine wichtige Rolle beim Proteinimport in Peroxisomen. Das cytosolische DnaJ-homologe Protein Djplp der Bäckerhefe zum Beispiel ist absolut notwendig für einen effizienten Import peroxisomaler Matrixproteine (Hettema *et al.*, 1998). Nach diesen Befunden lag die Hypothese nahe, daß das an der cytosolischen Seite der Glyoxysomen verankerten DnaJ-Proteins aus Gurke eine wesentliche Rolle beim Proteinimport in Glyoxysomen übernehmen könnte (Preisig-Müller *et al.*, 1994). Man könnte sich beispielsweise vorstellen, daß das glyoxysomale DnaJp eine wichtige Aufgabe bei der Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen zu importierenden peroxisomalen Proteinen und den cytosolischen Signalsequenzerkennungsrezeptoren übernimmt. Vergleichbar der Situation beim nukleären Proteinimport könnte in Kooperation mit cytosolischen Hsp70-Isoformen eine Präsentation der peroxisomalen Targetingsequenzen gegenüber den Erkennungsrezeptoren erfolgen (Melchior und Gerace, 1995).

Die Hypothese erscheint attraktiv, daß das glyoxysomale DnaJp eine ähnliche Aufgabe wie das ebenfalls durch Farnesylierung membranverankerte Ydjlp der Bäckerhefe beim posttranslationalen Proteinimport in das ER übernehmen könnte, da die cytosolische Hsp70-Isoform 1 aus Gurke genau wie die cytosolische Hsp70-Isoform Ssa1 der Bäckerhefe sowohl mit einem membranassoziierten DnaJ-Protein als auch mit DnaJ-Proteinen wechselwirkt, die bei der Translation eine Rolle spielen (Lu und Cyr, 1998). Möglicherweise übernimmt das Ssa1-Protein wichtige Funktionen sowohl während der Translation, als auch beim posttranslationalen Proteinimport in das ER. Die Ssb-Hsp70-Isoformen in Bäckerhefe hingegen scheinen eine Funktion direkt am Ribosom zu übernehmen (Pfund *et al.*, 1998).

In Analogie zum Proteinimport in das ER übernehmen auch beim Proteinimport in Mitochondrien *Molecular Chaperones* eine wichtige Funktion, sowohl innerhalb als auch außerhalb des Zellorganells im Cytosol (Mihara und Omura, 1996; Terada *et al.*, 1997). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß das farnesylierte humane DnaJ-Protein HSDJ an frühen Schritten beim Proteinimport in Mitochondrien beteiligt ist (Kanazawa *et al.*, 1997). Die Vermutung liegt nahe, daß die über einen Farnesylrest in der Membran verankerten DnaJ-Proteine bei allen drei Zellorganellen ähnliche Aufgaben beim Proteinimport übernehmen.

Was die Beteiligung von *Molecular Chaperones* beim Proteinimport in Peroxisomen betrifft, ergeben die gegenwärtigen Kenntnisse kein eindeutiges Bild über die Verteilung und genaue Funktion von Hsp70s und DnaJ-Proteinen in Peroxisomen. Möglicherweise ergibt sich ein recht komplexes Bild wie beim Proteinimport in das ER oder in Mitochondrien.

## 5 Zusammenfassung

DnaJ-Proteine sind in eukaryontischen Zellen in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert. Glyoxysomen und Peroxisomen besitzen auf ihrer cytosolischen Seite ein membrangebundenes DnaJ-Protein. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Hsp70 als Partnerproteine des an der cytosolischen Seite von Glyoxysomen verankerten DnaJ-Proteins aus Gurke identifiziert werden.

Es wurden zwei Gene, die für cytosolische Hsp70-Isoformen codieren, aus Gurkenkotyledonen isoliert und charakterisiert. Die zugehörigen cDNAs wurden kloniert und als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* bakteriell exprimiert und gereinigt.

Verschiedene DnaJ-Proteine wurden als Fusionsproteine mit His-Tag exprimiert und gereinigt. In Bindungsversuchen mit gereinigten His-DnaJ-Proteinen an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose konnte die cytosolische Hsp70-Isoform 1 in einem binären Komplex nachgewiesen werden. Sowohl das *in vitro* translatierte und radioaktiv markierte cytHsp70-1 als auch das gereinigte GST-Hsp70-Fusionsprotein der Isoform 1 konnten in Anwesenheit von 2 mM ADP einen stabilen Komplex mit der löslichen Form des DnaJp aus Gurke ausbilden. Auch mit heterologen DnaJ-Proteinen aus der Ölhefe *Apiotrichum curvatum* und dem Oomyceten *Phytophthora megasperma* konnte die cytosolische Hsp70-Isoform 1 bei Anwesenheit von 2 mM ADP in einem binären Komplex an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose nachgewiesen werden.

Der Komplex zwischen der cytosolischen Hsp70-Isoform 1 und DnaJp wurde eingehender untersucht:

Durch die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen der auf der Außenseite von Glyoxysomen verankerten Form des DnaJp und verschiedenen Hsp70-Isoformen aus Gurke. Eine spezifische Bindung an die Oberfläche von Glyoxysomen konnte nur bei der cytosolischen Hsp70-Isoform 1 beobachtet werden. Diese Wechselwirkung war strikt abhängig von der Anwesenheit von ADP. Zugabe von ATP verhinderte die Bindung von cytHsp70-1 an Glyoxysomen. Eine Bindung des Hsp70-1 an Mitochondrien und Plasmamembranvesikel konnte nicht beobachtet werden. Andere Hsp70-Isoformen wie die cytosolische Isoform 2 oder die Hsp70-Isoformen von Chloroplasten oder des Endoplasmatischen Retikulums konnten nicht an Glyoxysomen gebunden werden.

Da auch die Analyse der enzymatischen Eigenschaften der beiden cytosolischen Isoformen von Hsp70 zeigte, daß die ATPase-modulierende Aktivität des DnaJp nur bei der Isoform 1 wirksam ist, wird es offensichtlich, daß es sich bei der cytosolischen Isoform 1 von Hsp70 um das Partnerprotein des an der cytosolischen Seite von Glyoxysomen verankerten DnaJ-Proteins aus Gurke handelt.

In der Matrix von Glyoxysomen konnten zwei verschiedene Hsp70-Isoformen nachgewiesen werden. Die beiden Isoformen unterschieden sich in ihrer molekularen Masse (72 kDa und 78 kDa) und hatten verschiedene isoelektrische Punkte (pI 4.9 für die größere Form und ~ pI 5.4 für die 72 kDa-Form). Außerdem konnten sie mit monospezifischen Antiseren unterschieden werden. Die kleinere Hsp70-Isoform ist immunologisch verwandt mit cytosolischen Hsp70 während die größere Isoform nur mit Antiserum gegen die plastidäre Hsp70-Isoform erkannt wurde. In der Matrix von Glyoxysomen konnte eine lösliche Form des DnaJp nachgewiesen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Ahnert, V., C. May, R. Gerke und H. Kindl (1996). Cucumber T-complex protein - Molecular cloning, bacterial expression and characterization within a 22-S cytosolic complex in cotyledons and hypocotyls. *Eur. J. Biochem.* **235**, 118-127.

Ballinger, C. A., P. Connell, Y. Wu, Z. Hu, L. J. Thompson, L. Y. Yin und C. Patterson (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4535-4545.

Bates, E. E. M., P. Vergne und C. Dumas (1994). Analysis of the cytosolic hsp70 gene family in zea mays. *Plant Mol. Biol.* **25**, 909-916.

Becker, J. und E. A. Craig (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* **219**, 11-23.

Behari, R. und A. Baker (1993). The carboxyl terminus of isocitrate lyase is not essential for import into glyoxysomes in an in vitro system. *J. Biol. Chem.* **268**, 7315-7322.

Behrends, W. (1986). Dissertation, Marburg. .

Bimston, D., J. Song, D. Winchester, S. Takayama, J. C. Reed und R. I. Morimoto (1998). BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *Embo J.* **17**, 6871-6878.

Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1522.

Boorstein, W. R., T. Ziegelhoffer und E. A. Craig (1994). Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. *J. Mol. Evol.* **38**, 1.

Borst, P. (1989). Peroxisome biogenesis revisited. *Biochimica et Biophysica Acta* **1008**, 1-13.

Boston, R. B., V. P.V. und E. Vierling (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32**, 191-222.



- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-253.
- Brodsky, J. L. und R. Schekman (1993). A sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J. Cell Biol.* **123**, 1355-1363.
- Chatton, B., P. Walter, J. P. Ebel, F. Lacroute und F. Fasiolo (1988). The yeast *VAS1* gene encodes both mitochondrial and cytoplasmic valyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* **263**, 52-57.
- Chen, S., V. Prapapanich, R. A. Rimerman, B. Honore und D. F. Smith (1996). Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins Hsp90 and Hsp70. *Mol. Endocrinol.* **10**, 682-693.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Corpas, F. J. und R. N. Trelease (1997). The plant 73 kDa peroxisomal membrane protein (PMP73) is immunorelated to molecular chaperones. *Eur. J. Cell Biol.* **73**, 49-57.
- Courtois-Verniquet, F. und R. Douce (1993). Lack of aconitase in glyoxysomes and peroxisomes. *Biochem. J.* **294**, 103-107.
- Cunniff, N. F. A. und W. D. Morgan (1993). Analysis of Heat Shock Element Recognition by Saturation Mutagenesis of the Human *HSP70.1* Gene Promotor. *J. Biol. Chem.* **268**, 8317-8324.
- Cyr, D. M. (1995). Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Lett.* **359**, 129-132.
- Cyr, D. M., T. Langer und M. G. Douglas (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 176-181.
- de Duve, C. und P. Baudhuin (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* **46**, 323-357.
- DeRocher, A. und E. Vierling (1995). Cytoplasmic HSP70 homologues of pea: differential expression in vegetative and embryonic organs. *Plant Mol. Biol.* **27**, 441-456.

Diefenbach, J. (1997). Diplomarbeit, Marburg. .

Distel, B., R. Erdmann, S. J. Gould, G. Blobel, D. I. Crane, J. M. Cregg, G. Dodt, Y. Fujiki, J. M. Goodman, W. W. Just, J. A. K. W. Kiel, W. H. Kunau, P. B. Lazarow, G. P. Mannaerts, H. W. Moser, T. Osumi, R. A. Rachubinski, A. Roscher, S. Subramani, H. F. Tabak, T. Tsukamoto, D. Valle, I. Vanderklei, P. P. Vanveldhoven und M. Veenhuis (1996). Unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J. Cell. Biol.* **135**, 1-3.

Douglass, S. A., R. S. Criddle und R. W. Breidenbach (1973). Characterization of deoxyribonucleic acid species from castor bean endosperm. Inability to detect a unique deoxyribonucleic acid species associated with glyoxysomes. *Plant Physiol.* **51**, 902-906.

Ellis, R. J. und S. M. van der Vies (1991). Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347.

Fernandes, M., H. Xiao und J. T. Lis (1994). Fine structure analyses of the drosophila and saccharomyces heat shock factor - heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res.* **22**, 167-173.

Flaherty, K. M., C. DeLuca-Flaherty und D. B. McKay (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**, 623-628.

Frederick, S. E., E. H. Newcomb, E. L. Virgil und W. P. Wergin (1968). Fine-structure characterization of plant microbodies. *Planta* **81**, 229-252.

Freeman, B. C., M. P. Myers, R. Schumacher und R. I. Morimoto (1995). Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* **14**, 2281-2292.

Fung, K. L., L. Hilgenberg, N. M. Wang und W. J. Chirico (1996). Conformations of the nucleotide and polypeptide binding domains of a cytosolic Hsp70 molecular chaperone are coupled. *J. Biol. Chem.* **271**, 21559-21565.

Gabai, V. L., A. B. Meriin, J. A. Yaglom, V. Z. Volloch und M. Y. Sherman (1998). Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett.* **438**, 1-4.

Gao, B. C., J. Biosca, E. A. Craig, L. E. Greene und E. Eisenberg (1991). Uncoating of coated vesicles by yeast hsp70 proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 19565-19571.

- Gietl, C. (1990). Glyoxysomal malate dehydrogenase from watermelon is synthesized with an amino-terminal transit peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **87**, 5773-5777.
- Gietl, C. (1996). Protein targeting and import into plant peroxisomes. *Physiol Plant* **97**, 599-608.
- Glover, J. R., D. W. Andrews und R. A. Rachubinski (1994). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10541-10545.
- Glover, J. R., D. W. Andrews, S. Subramani und R. A. Rachubinski (1994). Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes *in vivo*. *J Biol Chem* **269**, 7558-7563.
- Gould, S. J., G.-A. Keller, M. Schneider, S. H. Howell, L. J. Garrard, J. M. Goodman, B. Distel, H. Tabak und S. Subramani (1990). Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J.* **9**, 85-90.
- Gould, S. J., G.-A. Keller und S. Subramani (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell Biol.* **105**, 2923-2931.
- Guan, K. und J. E. Dixon (1991). Eucaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved Thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with Glutathione S-Transferase. *Anal Biochem* **192**, 262-267.
- Gubler, U. und B. J. Hoffman (1983). A simple and very efficient method for generating complementary DNA libraries. *Gene* **25**, 263-269.
- Harlow, E. und D. Lane (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.
- Hartl, F. U., R. Hlodan und T. Langer (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 20-25.
- Hata, M. und K. Ohtsuka (1998). Characterization of HSE sequences in human Hsp40 gene: structural and promoter analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1397**, 43-55.

- Häusler, T., Y. D. Stierhof, E. Wirtz und C. Clayton (1996). Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *J. Cell Biol.* **132**, 311-324.
- Hendrick, J. P. und F.-U. Hartl (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- Hettema, E. H., B. Distel und H. F. Tabak (1999). Import of proteins into peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1451**, 17-34.
- Hettema, E. H., C. C. M. Ruigrok, M. G. Koerkamp, M. van den Berg, H. F. Tabak, B. Distel und I. Braakman (1998). The cytosolic DnaJ-like protein djplp is involved specifically in peroxisomal protein import. *J. Cell Biol.* **142**, 421-434.
- Hill, R. B., J. M. Flanagan und J. H. Prestegard (1995). H-1 and n-15 magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of escherichia coli DnaJ(1-78). *Biochemistry* **34**, 5587-5596.
- Hochuli, E. (1990). Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. In *Genetic Engineering, Principle and Methods*. J. K. Setlow, ed. (Plenum Press, New York), pp. 87-98.
- Höhfeld, J. (1998). Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. *Biol. Chem.* **379**, 269-274.
- Höhfeld, J., Y. Minami und F. U. Hartl (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-598.
- Huhse, B. und W. H. Kunau (1995). Protein import into peroxisomes: An exception to the rule? *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **60**, 657-662.
- Ibelgaufits, H. (1990). *Gentechnologie von A bis Z*. 1. Auflage Edition, Volume 1. korrigierter Nachdruck 1993 (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim), pp. 365-366.
- Imanaka, T., Y. Shiina, T. Takano, T. Hashimoto und T. Osumi (1996). Insertion of the 70 kDa peroxisomal membrane protein into peroxisomal membranes in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **271**, 3706-3713.

Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, San Diego).

Jaattela, M., D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki und M. Egeblad (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J.* **17**, 6124-6134.

Kamijo, K., S. Taketani, S. Yokota, T. Osumi und T. Hashimoto (1990). The 70 kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.* **265**, 4534-4540.

Kanazawa, M., K. Terada, S. Kato und M. Mori (1997). HSDJ, a human homolog of DnaJ, is farnesylated and is involved in protein import into mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 890-895.

Keller, G.-A., S. Krisans, S. J. Goild, J. M. Sommer, C. C. Wang, W. Schliebs, W. Kunau, S. Brody und S. Subramani (1991). Evolutionary conservation of a microbody targeting signal that targets proteins to peroxisomes, glyoxysomes, and glycosomes. *J. Cell Biol.* **114**, 893-904.

Kelley, W. L. (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 222-227.

Kelley, W. L. (1999). Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr. Biol.* **9**, R305-R308.

Koller, W. und H. Kindl (1977). Glyoxylate cycle enzymes of the glyoxysomal membrane from cucumber cotyledones. *Arch. Biochem. Biophys.* **181**, 236-248.

Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-872.

Kruse, C. (1981). Dissertation, Marburg. .

Kunau, W. H. und R. Erdmann (1998). Peroxisome biogenesis: Back to the endoplasmic reticulum? *Curr. Biol.* **8**, R299-R302.

Kyhse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.

- Ladner, R. D. und S. J. Caradonna (1997). The human UTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. *J. Biol. Chem.* **272**, 19072-19080.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.
- Langer, T., C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M. K. Hayer und F. U. Hartl (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683-689.
- Laufen, T., M. P. Mayer, C. Beisel, D. Klostermeier, A. Mogk, J. Reinstein und B. Bukau (1999). Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 5452-5457.
- Lee, M. S., R. T. Mullen und R. N. Trelease (1997). Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type I peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *Plant Cell* **9**, 185-197.
- Liberek, K., D. Skowrya, M. Zylicz, C. Johnson und C. Georgopoulos (1991). The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 14491-14496.
- Lin, T. Y., N. B. Duck, J. Winter und W. R. Folk (1991). Sequences of 2 Hsc 70 cDNAs from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol. Biol.* **16**, 475-478.
- Lin, X. Y., M. S. Chern und J. L. Zimmerman (1991). Cloning and characterization of a carrot hsp70 gene. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1245-1249.
- Lu, Z. und D. M. Cyr (1998). The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol. Chem.* **273**, 5970-5978.
- Lu, Z. und D. M. Cyr (1998). Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1. *J. Biol. Chem.* **273**, 27824-27830.
- Mackay, J. P. und M. Crossley (1998). Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 1-4.

- Mayer, M. P. und B. Bukau (1998). Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol. Chem.* **379**, 261-268.
- McNew, J. A. und J. M. Goodman (1996). The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 54-58.
- Melchior, F. und L. Gerace (1995). Mechanisms of nuclear protein import. *Curr. Biol.* **7**, 310-318.
- Miernyk, J. A., N. B. Duck, R. G. Shatters und W. R. Folk (1992). The 70-kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. *Plant Cell* **4**, 821-829.
- Mihara, K. und T. Omura (1996). Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp70. *Trends Cell Biol.* **6**, 104-108.
- Minami, Y., J. Hohfeld, K. Ohtsuka und F. U. Hartl (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J. Biol. Chem.* **271**, 19617-19624.
- Mireau, H., D. Lancelin und S. I.D. (1996). The same *Arabidopsis* gene encodes both cytosolic and mitochondrial alanyl-tRNA synthetases. *Plant Cell* **8**, 1027-1039.
- Multhoff, G., C. Botzler und R. Issels (1998). The Role of Heat Shock Proteins in the Stimulation of an Immune Response. *Biol. Chem.* **379**, 295-300.
- Natsoulis, G., F. Hilger und G. R. Fink (1986). The HTS1 gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine-tRNA synthetases. *Cell* **46**, 235-243.
- Netzer, W. J. und F. U. Hartl (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 68-73.
- O'Brien, M. C. und D. B. McKay (1993). Threonine 204 of the chaperone protein Hsc70 influences the structure of the active site, but is not essential for ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **268**, 24323-24329.
- O'Brien, M. C. und D. B. McKay (1995). How potassium affects the activity of the molecular chaperone hsc70. I. Potassium is required for optimal ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 2247-2250.

- O'Farrel, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Olsen, L. J. (1998). The surprising complexity of peroxisome biogenesis. *Plant Mol. Biol.* **38**, 163-189.
- Olsen, L. J. und J. J. Harada (1995). Peroxisomes and their assembly in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 123-146.
- Opperdoes, F. R. (1987). *Peroxisomes in Biology and Medicine*, H. D. Fahimi und H. Sies, eds. (Springer Verlag, Berlin), pp. 426-435.
- Padidam, M., V. S. Reddy, R. N. Beachy und C. M. Fauquet (1999). Molecular characterization of a plant mitochondrial chaperone GrpE. *Plant Mol. Biol.* **39**, 871-881.
- Palleros, D. R., K. L. Reid, L. Shi, W. J. Welch und A. L. Fink (1993). ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K<sup>+</sup> but not ATP-hydrolysis. *Nature* **365**, 664-666.
- Palleros, D. R., L. Shi, K. L. Reid und A. L. Fink (1994). Hsp70-protein complexes - complex stability and conformation of bound substrate protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 13107-13114.
- Palleros, D. R., W. J. Welch und A. L. Fink (1991). Interaction of hsp70 with unfolded proteins - effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5719-5723.
- Pfund, C., N. Lopez-Hoyo, T. Ziegelhoffer, B. A. Schilke, P. Lopez-Buesa, W. A. Walter, M. Wiedmann und E. A. Craig (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *Embo J.* **17**, 3981-3989.
- Polacheck, I. und E. Cabib (1981). A simple procedure for protein determination by the Lowry Method in dilute solutions and in the presence of interfering substances. *Anal. Biochem.* **117**, 311-314.
- Prapapanich, V., S. Chen, S. C. Nair, R. A. Rimerman und D. F. Smith (1996). Molecular cloning of human p48, a transient component of progesterone receptor complexes and an Hsp70-binding protein. *Mol. Endocrinol.* **10**, 420-431.
- Preisig-Müller (1993). Dissertation, Marburg. .



- Preisig-Müller, R. und H. Kindl (1993). Thiolase mRNA translated *in vitro* yields a peptide with a putative N-terminal presequence. *Plant Mol. Biol.* **22**, 59-66.
- Preisig-Müller, R., G. Muster und H. Kindl (1994). Heat shock enhances the amount of prenylated DnaJ protein at membranes of glyoxysomes. *Eur. J. Biochem.* **219**, 57-63.
- Rassow, J., W. Voos und N. Pfanner (1995). Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. *Trends Cell Biol.* **5**, 207-212.
- Rhodin, J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cell of the mouse kidney. PhD thesis, Stockholm.
- Roberts, J. K. und J. L. Key (1991). Isolation and characterization of a soybean hsp70 gene. *Plant Mol. Biol.* **16**, 671-683.
- Rochester, D. E., J. A. Winer und D. M. Shah (1986). The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *Embo J.* **5**, 451-458.
- Roggenkamp, R. (1992). Targeting signals for protein import into peroxisomes. *Cell Biochem. Func.* **10**, 193-199.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. Mullis und H. A. Ehrlich (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Ehrlich und N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schlenstedt, G., S. Harris, B. Risse, R. Lill und P. A. Silver (1995). A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J. Cell. Biol.* **129**, 979-988.

Schlicher, T. und J. Soll (1997). Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol. Biol.* **33**, 181-185.

Shulga, N., P. James, E. A. Craig und D. S. Goldfarb (1999). A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *J. Biol. Chem.* **274**, 16501-16507.

Siebert, P. D., A. Chenchik, D. E. Kellogg, K. A. Lukyanov und S. A. Lukyanov (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1087-1088.

Simons, P. C. und D. L. Vander Jagt (1977). Purification of Glutathione S-Transferases from Human Liver by Glutathione-Affinity Chromatography. *Anal. Biochem.* **82**, 334-341.

Small, G. M., L. J. Szabo und P. B. Lazarow (1988). Acyl-CoA oxidase contains two targeting sequences each of which can mediate protein import into peroxisomes. *EMBO J.* **7**, 1167-1173.

Small, I., H. Wintz, K. Akashi und H. Mireau (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol. Biol.* **38**, 265-277.

Smith, D. F., L. Whitesell, S. C. Nair, S. Chen, V. Prapapanich und R. A. Rimerman (1995). Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90 binding agent. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6804-6812.

South, S. T. und S. J. Gould (1999). Peroxisome Synthesis in the Absence of Preexisting Peroxisomes. *J. Cell Biol.* **144**, 255-266.

Specht, V. (1997). Dissertation, Marburg. .

Specht, V., M. Lubeck und H. Kindl (1998). Heat shock transiently enhances the synthesis rate of Sis1p, a ribosome-associated DnaJ protein in the oleagenous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Yeast* **14**, 419-430.

Sriram, M., J. Osipiuk, B. C. Freeman, R. I. Morimoto und A. Joachimiak (1997). Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain. *Structure* **5**, 403-414.

Subramani, S. (1996). Convergence of model systems for peroxisome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 34-38.

Swinkels, B. W., S. J. Gould, A. G. Bodnar, R. A. Rachubinski und S. Subramani (1991). A novel cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* **10**, 3255-3262.

Szabo, A., R. Korszun, F. U. Hartl und J. Flanagan (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* **15**, 408-417.

Takayama, S., Z. Xie und J. C. Reed (1999). An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* **274**, 781-786.

Terada, K., M. Kanazawa, B. Bukau und M. Mori (1997). The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding. *J. Cell Biol.* **139**, 1089-1095.

Vogeli, G. und P. S. Kaytes (1987). Amplification, storage, and replication of cDNA-libraries. *Methods Enzymol.* **152**, 407-415.

Wall, D., M. Zylicz und C. Georgopoulos (1994). The NH<sub>2</sub>-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* dnaj protein stimulate the ATPase activity of dnaK and are sufficient for lambda replication. *J. Biol. Chem.* **269**, 5446-5451.

Walton, P., M. Wendland, S. Subramani, R. A. Rachubinski und W. J. Welch (1994). Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J. Cell Biol.* **125**, 1037-1046.

Walton, P. A., P. E. Hill und S. Subramani (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Biol. Cell.* **6**, 675-683.

Wang, T.-F., J. Chang und C. Wang (1993). Identification of the Peptide Binding Domain of hsc70. *J. Biol. Chem.* **268**, 26049-26051.

Wilbanks, S. M., C. DeLuca-Flaherty und D. B. McKay (1994). Structural Basis of the 70-Kilodalton Heat Shock Cognate Protein ATP Hydrolytic Activity. I. Kinetic analysis of active site mutants. *J. Biol. Chem.* **269**, 12893-12898.

- Wimmer, B., F. Lottspeich, I. van der Klei, M. Veenhuis und C. Gietl (1997). The glyoxysomal and plastid molecular chaperones (70-kDa heat shock protein) of watermelon cotyledons are encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 13624-13629.
- Winter, J. A., R. Wright, N. Duck, C. Gasser, R. Fraley und D. Shah (1988). The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl stress. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 315-319.
- Wollny, H. E. (1991). Absorptionsmessung im UV-Bereich. In *Gentechnische Methoden*. S. Bertram und H. G. Gassen, eds. (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart), pp. 2.
- Wu, C. H., T. Caspar, J. Browse, S. Lindquist und C. Somerville (1988). Characterization of an HSP70 Cognate Gene Family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **88**, 731-740.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1997 bis Oktober 1999 am Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie, der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Für die interessante Themenstellung, stete Diskussionsbereitschaft und freundliche Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Kindl.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die Unterstützung und das Überlassen von Antikörpern.

Bei der Arbeitsgruppe Döbelstein möchte ich mich für das Überlassen von Vektoren bedanken.